

***Untersuchungen zur genetischen Variabilität
des humanen, neonatalen Fc-Rezeptors***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Braeunlich, Christian Georg

aus Fulda

Gießen 2012

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der
Justus Liebig-Universität Gießen
Leiter: Professor Dr. med. Gregor Bein

1. Gutachter: Prof. Dr. Sachs

2. Gutachter: Prof. Dr. Müller

Tag der Disputation: 8.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ausgangssituation und Zielsetzung	1
1.2	Studienlage	2
1.2.1	Der Antikörper-Rezeptor (FcRn)	2
1.2.1.1	Benennung	2
1.2.1.2	FcRn – Anfänge und frühe Erkenntnisse	3
1.2.1.3	Isolation des Rezeptors	5
1.2.1.4	Proteinstrukturanalyse	5
1.2.1.5	Studien zur genetischen Struktur des Rezeptors	8
1.2.1.5.1	Sequenzierung der für die FcRn- α -Kette kodierenden Genregion	8
1.2.1.5.2	Genomische Struktur der humanen FcRn- α -Kette	8
1.2.1.5.3	Die Promotorregion der FcRn- α -Kette	9
1.2.1.5.4	genetische Regulation von FcR	9
1.2.1.6	funktionale Studienansätze zum FcRn-Rezeptor	10
1.2.1.6.1	Rezeptor-Funktions-Studien	10
1.2.1.6.2	Zell-Studien	11
1.2.1.6.3	Studien am Tiermodell	12
1.2.1.7	Vorkommen u. Gewebenachweis des Rezeptors	13
1.2.1.7.1	Proteinnachweis von FcRn	13
1.2.1.7.2	RNA-Nachweis des FcRn-Rezeptors	14
1.2.1.7.3	indirekter, funktioneller FcRn-Nachweis:	14
1.2.1.8	Funktionen des FcRn-Rezeptors	15
1.2.1.8.1	IgG-Transport über Epithelgewebe	15

1.2.1.8.2	Regulation der IgG-Homöostase im menschlichen und tierischen Organismus	16
1.2.1.8.3	Regulation der Albumin-Homöostase	16
1.2.1.8.4	weitere immunologische Funktionen:	16
1.2.2	Die Verhältnisse an der humanen Plazenta	17
1.2.2.1	Direkter, plazentarer FcRn-Nachweis:	20
1.2.2.2	Indirekte, plazentare FcRn-Nachweise:	20
1.2.3	Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)	21
1.2.4	Potenzielle klinisch-therapeutische Bedeutung des FcRn-Rezeptors	23
1.2.4.1	Allo- und Autoimmunerkrankungen:	23
1.2.4.2	Weitere klinische Bedeutung des FcRn-Rezeptors	24
2	Material und Methoden	25
2.1	DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut	25
2.2	Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	25
2.2.1	Geschachtelte („nested“) PCR	29
2.3	Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel	29
2.4	PCR-Produkt-Aufreinigung	30
2.5	Natriumacetatfällung von DNA	30
2.6	DNA-Sequenzierung	30
2.7	EDV- gestützter Sequenzvergleich	31
2.8	Restriktionsenzymverdau (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)	31
2.9	Isolierung von Monozyten	31
2.10	RNA-Extraktion aus Monozyten	32

2.11	RNA-Transkription in cDNA (in vitro Transkription)	32
2.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.13	Quantifizierung FcRn-spezifischer Transkripte mittels TaqMan® Echtzeit PCR (Real-time PCR)	33
2.14	Transformation kompetenter Escherichia coli-Zellen	33
2.15	Renilla-Luciferase Reportergen-Assay	34
2.16	Isolierung von Plasmiden aus Escherichia coli-Zellen	35
2.17	Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien	36
2.18	Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
2.19	Adhäsionstest mit mononucleären Zellen	36
2.20	Statistische Analysen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Nachweis individueller, genetischer Unterschiede innerhalb der kodierenden Region des FcRn-Gens	38
3.1.1	SNP in AS 171 (C3646T)	38
3.2	Nachweis genetischer Variabilitäten in der Promotorregion des FcRn-Gens	40
3.2.1	Häufigkeit des VNTR-Polymorphismus	41
3.2.2	Assoziation zwischen SNP in AS 171 und VNTR-Polymorphismus	43
3.3	Monozytärer Nachweis differentieller FcRn-Transkription	44
3.3.1	quantitative Bestimmung der Rezeptor-Gen-Transkription <i>in vivo</i> anhand von monozytärer RNA	44
3.3.2	<i>in vitro</i> -Nachweis differentieller Transkriptionsaktivität der FcRn-Promotor-(VNTR)-Allele anhand von Reporter-Gen-Assays	45

3.4	monozytärer Nachweis differentieller FcRn-Translation	46
4	Schluss teil mit Diskussion der Ergebnisse	49
5	Zusammenfassung	55
6	Summary	56
7	Abkürzungsverzeichnis	57
8	Darstellungs-, Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis	59
	Abbildungen:	59
	Tabellen:	60
9	Literaturverzeichnis / Quellenangaben	61
10	Publikationsverzeichnis	83
11	Ehrenwörtliche Erklärung	84
12	Danksagung	85

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation und Zielsetzung

Im Falle einer Schwangerschaft werden IgG-Antikörper als Träger der humoralen, passiven Immunität von der Mutter an die Nachkommen weitergegeben, wo sie dann für immunologische Abwehrfunktionen zur Verfügung stehen, ein Phänomen, das bereits 1892 Paul Ehrlich mittels Ammenversuchen an Mäusen nachweisen konnte (Ehrlich 1892). Beim Menschen geschieht dieser aktive Transport von Antikörpern während der Schwangerschaft über die Plazenta, sodass bereits bei der Geburt IgG-Antikörper zum Schutz vor Infektionen im Kreislauf des Kindes zur Verfügung stehen (Hemmings & Brambell 1961, Firan et al. 2001, Roopenian et al. 2003).

Unter bestimmten Umständen können die von der Mutter auf den Feten übertragenen Antikörper sich jedoch als pathogener Faktor gegen Blutbestandteile des Kindes richten, wie es bei dem Morbus hämolyticus neonatorum (MHN) und der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) der Fall ist, wobei letztere Erkrankung mit einer Häufigkeit von 1:1000-1:2000 seit der Einführung und Verbesserung der Rhesusprophylaxe durch Anti-D bei dem MHN zunehmend an klinischem Interesse gewann (Kiefel et al. 1994).

Auf der Suche nach einem Prädiktor für den Schweregrad dieser Erkrankungen wurde u.a. die Konzentration pathogener Antikörper im mütterlichen Blut diskutiert und untersucht, wobei in einigen Studien für die FNAIT (Williamson et al. 1998, Ohto et al. 2000) bzw. für den MHN (Hadley et al. 1991, Garner et al. 1995) ein Zusammenhang beschrieben wurde, andere Autoren jedoch bei der FNAIT (Proulx et al. 1994, Kurz et al. 1999) bzw. bei dem MHN (Zupanska et al. 1989, van Dijk et al. 1995) keinen Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Schweregrad der Erkrankung nachweisen konnten; in neuere Studien wurde zuletzt wieder ein Zusammenhang zwischen Antikörper-Konzentration und Erkrankungsrisiko des Feten vermutet (Skogen et al. 2009, Bertrand et al. 2011), letztere Studie blieb jedoch nicht unwidersprochen (Sachs et al. 2011).

Aufgrund der zunächst widersprüchlichen Studienergebnisse bezüglich des Zusammenhanges zwischen der Konzentration pathogener Antikörper im mütterlichen Serum und klinischem Erkrankungsverlauf wurden andere Einflussgrößen, wie bspw. die funktionelle Reife der fetalen Milz, die Antikörper-Transportrate über die Plazenta,

unterschiedliche Glykolsylierungen und Halbwertszeiten sowie verschiedene Allotypen der beteiligten Antikörpersubklassen, die Beteiligung von den IgG-Transport hemmenden Antikörpern sowie auch genetische Polymorphismen der am Antikörper-Transport beteiligten Fc-Rezeptoren diskutiert (Dooren et al. 1993, Hadley et al. 1998, de Haas 2001, Chen et al. 2010).

Ausgehend von der letzteren Hypothese genetischer Variabilitäten der beteiligten IgG-Transport-Rezeptoren nahm ich mir vor, das kodierende Gen für den plazentaren IgG-Transportrezeptor FcRn, der nach derzeitiger Studienlage von zentraler Bedeutung für die IgG-Homöostase („Antikörper-Recycling“) sowie für den Antikörper-Transport, hier speziell dem maternofetalen IgG-Transport (nicht nur beim Menschen) ist (Junghans 1997, Ghetie et al. 1997, Ghetie 2000, Roopenian et al. 2007, Baker et al. 2009, Chen et al. 2010), auf genetische Variabilitäten als mögliche, individuelle Einflussfaktoren auf den klinischen Verlauf der FNAIT zu untersuchen, um hieraus prädiktive Aussagen bezüglich des Krankheits-Verlaufes und -Ausprägungsgrades ableiten zu können.

1.2 Studienlage

1.2.1 Der Antikörper-Rezeptor (FcRn)

1.2.1.1 Benennung

FcRn ist die hier verwendete, meist gebräuchliche Bezeichnung für den Rezeptor und steht für „neonataler Fc-Rezeptor“.

„Fc“ bezeichnet das kristallisierbare Fragment des IgG-Moleküls; „neonatal“ bezieht sich auf das Vorkommen und der erstmaligen Isolation des Rezeptors aus dem Darm neugeborener Ratten durch Jones und Waldmann (Jones & Waldman 1972, Junghans 1997).

Junghans schlug darüber hinaus FcRB (= Brambell-Rezeptor) zu Ehren des Erstbeschreibers des Rezeptors, Francis William Rogers Brambell (1901-1979) sowie FcRp vor, um mit „p“ die Protektion von IgG in Abgrenzung zu dessen Transport, wie beim Neugeborenen (FcRn), unterscheiden zu können (Junghans 1997).

Das Gen für die α -Kette des Rezeptors wird mit FCGRT (zusammengesetzt aus: FC-Fragment des IgG, Rezeptor, Transporter) bezeichnet (HUGO Gene Nomenclature Committee, 2010, <http://www.genenames.org>).

1.2.1.2 FcRn – Anfänge und frühe Erkenntnisse

Anhand seiner Untersuchungen über die „Immunität durch Vererbung und Säugung“ postulierte Paul Ehrlich 1892, dass Antikörper als Träger humoraler, passiver Immunität über die Milch (Colostrum) von stillenden Muttertieren an säugende Jungtiere weitergegeben werden (Ehrlich 1892).

Ca. 60 Jahre später fand Brambell am Kaninchenmodell heraus, dass Antikörper spezies- gewebe- und klassenspezifisch über die materno-fetale Barriere transportiert werden (Brambell et al. 1950, 1951, 1953, Batty et al. 1954).

Durch Vergleiche seiner Untersuchungsergebnisse am Kaninchen mit denen anderer Spezies (Geflügel u. Ratten), vermutete Brambell zunächst einen entodermalen, über Chorionzotten des Dottersackes, die Amnionflüssigkeit und fetale Darmzellen erfolgenden maternofetalen Antikörpertransport auch für den Menschen (Brambell et al. 1954, 1956).

Später fand er jedoch, dass der IgG-Transport bei Primaten plazentar (mesodermal) erfolgt (Brambell 1961) und Brambell vermutete einen Transport über den Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Brambell 1969, vgl. Kap. 1.2.1.8.1).

Anhand von Versuchen an säugenden Ratten und Mäusen entdeckte Brambell, dass der Antikörpertransport über den Darm durch heterologe Antikörper hemmbar war (Interferenz-Phänomen; kompetitive Hemmbarkeit) und postulierte die Existenz eines Antikörper-spezifischen, intrazellulär gelegenen Rezeptors, der nach zunächst unspezifischer, pinozytotischer Antikörperaufnahme der Zellen die Antikörper zum Weitertransport binden würde (Brambell et al. 1958).

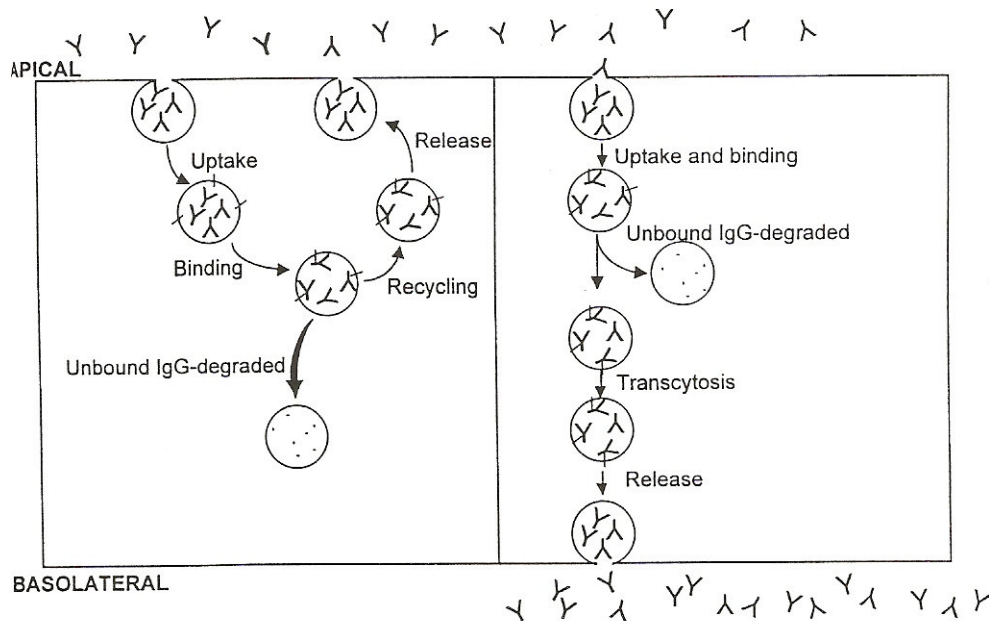
Pepsin- und Papain-Verdau von IgG führten zu der Erkenntnis, dass sich die Regionen des Moleküls, die mit seinem Transport und der Antigen-Erkennung verbunden sind, voneinander unterscheiden (Brambell et al. 1959, 1960, Hemmings & Brambell 1961).

1963 folgerte Brambell, dass sich der postulierte IgG-Transport-Rezeptor, im Unterschied zur Situation bei der anaphylaktischen Sensibilisierung, in den Wandungen pinozytotischer Vesikel befinden müsse und forderte beim Antikörpertransport über die Antikörper-Bindung hinaus einen Mechanismus der Antikörper-Wieder-Freisetzung (Brambell 1963).

Aus dem Vergleich mit dem γ -Globulin-Katabolismus schloß Brambell, dass für beide Belange, den Antikörper-Abbau sowie dessen Weitergabe und Transport, derselbe zelluläre Rezeptor-Mechanismus im Sinne von Protektions- bzw. Transport-Rezeptoren innerhalb pinozytotischer Vesikel zugrunde liegen müsse und entwickelte

ein Rezeptormodell, das durch Bindung von IgG innerhalb von pinozytotischen Vesikeln die so gebundenen Antikörper vor dem lysosomalen Abbau bewahren sollte, indem es sie entweder zum selben („Recycling“-Modus) oder entgegengesetzten (Transport-Modus) Zellpol der Antikörperaufnahme (zurück-) transportiert um sie dort jeweils wieder freizusetzen (Brambell et al. 1964, Brambell 1966, Junghans et al. 1996) (s. Abb 1, vgl. Kap. 1.2.1.8.2).

Abb. 1: IgG-Aufnahme, -Recycling u. -Transport (nach Ghetie & Ward 2000)



Experimente mit Radio-Iod-markierten IgG-Antikörperfragmenten an enterozytären, mikrovillösen Membranen neugeborener Ratten bestätigten, dass die Antikörper-Bindung an der IgG-Fc-Region und nicht an der Fab-Region erfolgt und streng pH-abhängig, mit einem Maximum bei pH 6 und kaum noch bei pH 7,4 erfolgt (Jones & Waldmann 1972, Rodewald 1976), eine Eigenschaft, die 1984 zur Isolation des Rezeptors genutzt wurde (Rodewald & Kraehenbuhl 1984, vgl. Kap. 1.2.1.3) und der den von Brambell postulierten Antikörper-Bindungs- und Wieder-Freisetzungs-Mechanismus darstellt (s.o.).

Anhand Ferritin-konjugierter Immunglobuline konnte an Darmzellen neugeborenen Ratten die IgG-spezifische Antikörper-Bindung auf der Zelloberfläche und ihre pinozytotische Aufnahme innerhalb von „coated vesicles“ auf mikroskopisch-mikrozellulärer Ebene dargestellt werden (Rodewald 1973).

Für Mäuse konnte eine Antikörper-subklassenspezifische Bindung an intestinale Rezeptoren, die umgekehrt proportional mit der relativen Konzentration dieser

Antikörper-Subklassen in der Mäusemilch korrelierte, nachgewiesen werden, wobei IgG 2a besser gebunden wurde als IgG 3 (Guyer et al. 1976).

1.2.1.3 Isolation des Rezeptors

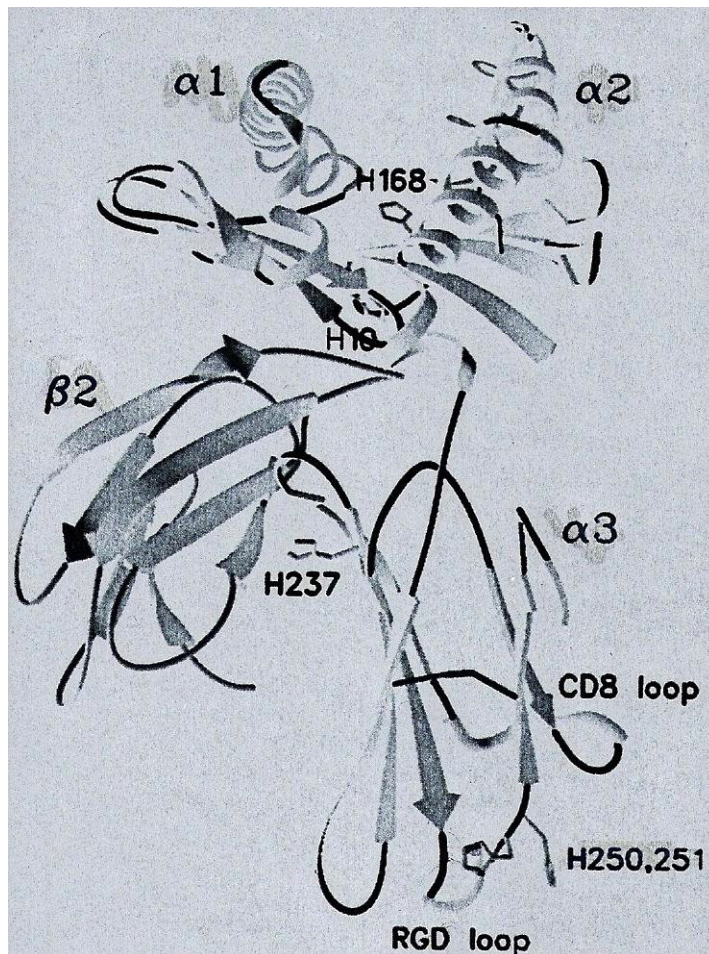
Mittels immobilisierter IgG-Moleküle liess sich das FcRn-Rezeptorprotein pH-spezifisch bei saurem pH aus Dünndarmzellen 11-tägiger Ratten isolieren, elektrochromatographisch darstellen und als Heterodimer aus zwei Bestandteilen von jeweils 50 („p51“) u. 18 („p14“) kDa beschreiben (Rodewald & Kraehenbuhl 1984; Simister & Mostov 1989), wovon p14 als β_2 -Mikroblubulin identifiziert wurde (Simister & Rees 1985, Simister 1989).

1.2.1.4 Proteinstrukturanalyse

Die schwerere Kette (p51) des so aufgereinigten Rezeptormoleküls wurde sequenziert und aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den MHC-Klasse I-Histokompatibilitätsgenen analog als „ α -Kette“ bezeichnet (Simister & Mostov 1989; Simister et al. 1997).

Spektroskopie und Kristallisations-Studien mit exprimierten, sezernierten Formen des FcRn-Rezeptors bestätigten die Ähnlichkeit der α -Kette mit den MHC-Klasse I-Molekülen auf Proteinebene mit 3 extrazellulären Domänen (s. Abb. 2), wobei das Rezeptormolekül, anders, als für diese Proteinfamilie bekannt, nicht mit Peptiden assoziiert vorlag (Gastinel et al. 1991).

Abb. 2: Struktur-Modell für FcRn als MHC-Klasse I-Molekül (Raghavan et al. 1994)



Die Kristallisationsstudien zeigten, dass die bei MHC-Klasse I-Molekülen vorhandene Peptidantigen-bindende Vertiefung versperrt und dadurch nicht in der Lage war, Peptide zu binden (Burmeister, Gastinel et al. 1994).

Es zeigte sich, dass lösliche IgG-FcRn-Komplexe bei pH 6.0-6.5 stabiler waren, als bei pH 7.5, was pH-abhängige Konformationsänderungen des Rezeptors vermuten ließ (Raghavan et al. 1993).

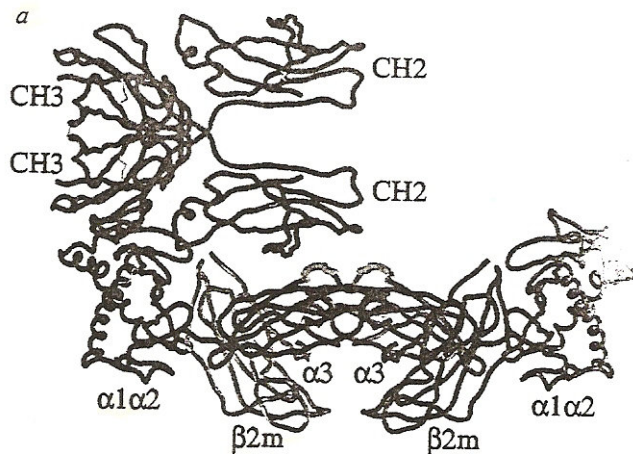
Die Strukturanalysen ergaben ferner, dass sich die IgG-FcRn-Bindungstelle zwischen den C_H2- und C_H3-Domänen des IgG-Moleküls, seitlich am FcRn-Rezeptormolekül und abseits von der Peptid-Bindungsstelle der MHC I-Moleküle befindet (Burmeister et al. 1994).

Die Rezeptor-Antikörper-Stöchiometrie schien dabei bei der Ratte in 2:1-Relation vorzuliegen (Huber et al. 1993, Vaughn & Bjorkman 1997, Martin & Bjorkman 1999) und es wurde sowohl eine 2:1-„lying-down“- als auch eine „standing-up“-Struktur des Heterodimers postuliert (Burmeister et al. 1994) (s. Abb. 3); die Antikörper-

bindungsfördernde Rezeptor-Dimerisation auf der Zellmembran könnte dabei als Endozytose-Signal dienen (Raghavan et al. 1995).

Für den homologen Rezeptor der Maus (Sánchez et al. 1999) und des Menschen (West & Bjorkman 2000) ergaben sich jedoch auch Hinweise auf eine 1:1-Stöchiometrie.

Abb. 3: 2:1-Heterotrimer, bestehend aus 2 FcRn-Molekülen der Ratte in „lying-down“-Anordnung und einem Fc-IgG-Molekül (Burmeister, Huber et al. 1994)



Als hauptsächlich verantwortlich für die pH-abhängige Antikörper-Rezeptor-Bindung wurden Histidinreste im IgG-Molekül an der CH2-CH3-Schnittstelle (Raghavan et al. 1994), sowie auch im FcRn-Molekül (Raghavan et al. 1995; vgl. Abb. 2) identifiziert und die Bindungscharakteristika der FcRn-IgG-Bindung wurde zusammenfassend denen anderer Fc-Rezeptoren gegenübergestellt (Raghavan & Bjorkman 1996).

Durch gentechnisch erzeugte Aminosäureaustausche an FcRn-Konstrukten wurden weitere, für die FcRn-Dimerisation sowie für die IgG-FcRn-Bindung relevante Aminosäuren identifiziert und beschrieben (Vaughn, Milburn et al. 1997).

1.2.1.5 Studien zur genetischen Struktur des Rezeptors

1.2.1.5.1 Sequenzierung der für die FcRn- α -Kette kodierenden Genregion

Durch die Isolation des Rezeptors anhand von immobilisierten IgG-Molekülen war es möglich, Antiserum gegen FcRn zu erzeugen und durch Immunoselektion FcRn-spezifische DNA einer Genbibliothek aus Dünndarmzellen 11-tägiger Ratten zu klonieren und zu sequenzieren (Simister & Mostov 1989).

Anhand der Nucleotid-Sequenz wurde bereits auf die Primärstruktur der α -Kette des Rezeptors mit drei extrazellulären Domänen sowie einer transmembranen Region, homolog zu Klasse I-Histokompatibilitätsgenen (MHC-I) geschlossen (Simister & Mostov 1989).

Nachfolgend wurde zunächst die Basensequenz des FcRn-Gens der Maus (Kandil et al. 1995), später die des Menschen (Mikulska et al. 2000) veröffentlicht.

Gen-Kartierungen zeigten, dass sich das Gen für die FcRn- α -Kette bei der Maus auf Chromosom 7 (Ahouse et al. 1993), beim Menschen auf Chromosom 19 (Kandil et al. 1996, Mikulska et al. 2000) und damit jeweils außerhalb des MHC-Komplexes befindet.

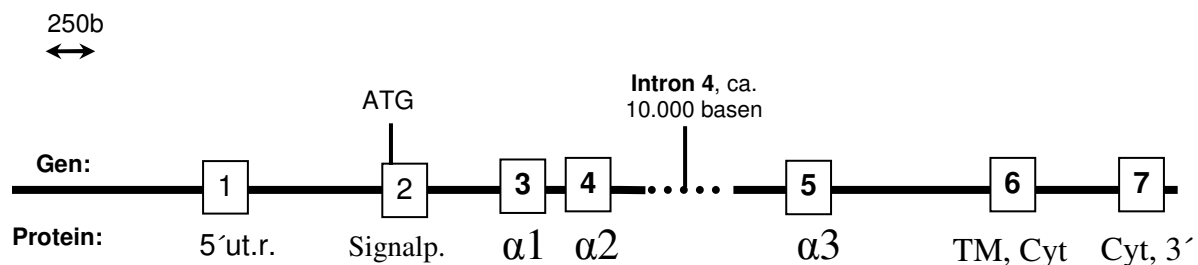
Phylogenetische Vergleiche der FcRn- α -Kette mit verschiedenen MHC-Klasse I- und CD1-Molekülen legten eine Entwicklung des FcRn-Rezeptors aus dem MHC-I-Gen-Komplex früh in der Entwicklung der Säugetiere, noch vor der Abzweigung der Beuteltiere, nahe (Ahouse et al. 1993; Kandil et al. 1995), wobei die Peptid-bindende Funktion zugunsten der IgG-Antikörper-Bindung verloren gegangen war (Burmeister 1994).

1.2.1.5.2 Genomische Struktur der humanen FcRn- α -Kette

Die Gensequenz der humanen FcRn- α -Kette wurde aus Chromosom 19-spezifischen Genbibliotheken kloniert und veröffentlicht (AF220542; Mikulska et al. 2000). [Erleuterung: Beide Quellen benutzen jeweils eine unterschiedliche Einteilung des FcRn-Gens sowohl, was die Basennummerierung als auch die Benennung der einzelnen Exons und Introns betrifft: Während Mikulska et al. die nicht-translatierte Region als auch die für das Signalpeptid kodierende Region als Exon 1 resp. 2 mitzählen und somit von insgesamt 7 Exonen (und 6 Intronen) ausgehen, beginnt AF220542 mit der Zählung der Exone erst bei den für das FcRn-Protein kodierenden Exonen (Exon 1-5), mit der Basenzählung aber ca. 1000 Basen 5' (upstream) von Mikulska et al.; ich beziehe mich im Folgenden in der Basenzählung auf AF220542, bei der Zählung der Exone in erster Linie auf Mikulska et al.]

Das FcRn-Gen besteht demnach aus 7 (resp. 5) Exons, 6 (resp. 4) Introns und erstreckte sich über ca. 14 kb (Mikulska et al. 2000), wobei Exon 1 die Sequenz für den größten Teil der 5' untranslatierten Region der FcRn alpha-Ketten-mRNA beinhaltet und Exon 2 für den Rest dieser untranslatierten mRNA, für die Signal-Sequenz sowie für die erste Aminosäure der Alpha-Kette kodiert. Exon 3 (1) kodiert demnach für den Rest der $\alpha 1$ -Domäne, Exon 4 (2) für die $\alpha 2$ -Domäne, Exon 5 (3) für die $\alpha 3$ -Domäne, Exon 6 (4) für die transmembrane sowie für die ersten 7 Aminosäuren der zytoplasmatischen Region, Exon 7 (5) für die letzten 36 AS der zytoplasmatischen sowie für eine 216-bp 3'-untranslatierte Region. Intron 4 (2) ist verhältnismässig groß und beinhaltet ca. 10.000 Basenpaare (Mikulska et al. 2000, s. Abb. 4).

Abb. 4: genomische Struktur des FcRn-Gens nach Mikulska et al., modifiziert:



Rechtecke: Exons 1-7; darunter sind jeweils die Domänen der α -Kette des Rezeptors aufgeführt, für die die einzelnen Exons kodieren: 5'ut.r.: 5' untranslatierte Region; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: extrazelluläre Domänen; TM: transmembrane Region, Cyt: Cytoplasmatische Regionen, ATG: Start-Kodon für die Translation

1.2.1.5.3 Die Promotorregion der FcRn- α -Kette

Die Promotorregion des Gens der humanen FcRn- α -Kette wurde neben der Gensequenz der FcRn- α -Kette aus Chromosom 19-spezifische Genbibliotheken kloniert, sequenziert und veröffentlicht (Mikulska et al. 2000).

1.2.1.5.4 genetische Regulation von FcRn

Für das FcRn-Gen der Ratte (Jiang et al. 2004) sowie der Maus (Tiwari & Junghans 2004) fanden sich verschiedene Elemente und Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen innerhalb der Promotorregion, die die FcRn-Transkriptionsaktivität in Zelllinien in vitro beeinflussten.

In einer Promotorstudie des humanen FcRn- α -Gens fanden sich zwei Transkriptions-Start-Signale ST1 und ST2 sowie verschiedene potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive, die bei der Regulation der FcRn-Expression, bspw. durch Interleukin-6, Glucokortikoide oder Schilddrüsenhormone, beteiligt sein könnten (Yu et al. 1999, Mikulska & Simister 2000).

Es wurde spekuliert, dass unterschiedliche FcRn-Genexpression bei Krankheitszuständen mit erhöhtem IgG-Katabolismus, wie bei längerem Fieber, schweren Verbrennungen oder einigen Formen der Myotonischen Dystrophie eine Rolle spielen könnten (Mikulska & Simister 2000).

Die Unterbrechung der IgG-Absorption und der FcRn mRNA-Expression im Darm neugeborener, mit Kortikosteroiden und Thyroxin behandelter Ratten zeigte hormonell gesteuerte FcRn-Regulation (Martín et al. 1993).

1.2.1.6 funktionelle Studienansätze zum FcRn-Rezeptor

1.2.1.6.1 Rezeptor-Funktions-Studien

In den frühen 1990er Jahren zeigten Ghetie, Ward et al. anhand von Antikörper-Hybrid-Studien, dass sowohl CH2 als auch CH3 der Fc-Region der IgG-Antikörper für die Aufrechterhaltung ihrer Konzentration in der Zirkulation von Mäusen sowie für deren intestinalen IgG-Transport notwendig waren, und schlossen daraus, dass dieser Bereich die Bindungsstelle für FcRn darstellt (Ghetie et al. 1996, Kim et al. 1994, Medesan et al. 1996, Ghetie & Ward 1997, 2000). Es wurde eine FcRn/IgG-1:1-Stoichiometrie postuliert und vermutet, dass sich die für die Kontrolle des Antikörper-Katabolismus und den Antikörper-Transport relevanten IgG-Regionen streng überlappen (Popov et al. 1995). Aufgrund dieser Studien sowie aus dem Ergebnis, dass β 2-Mikroglobulin-defiziente Mäuse geringere Halbwertszeiten für IgG-Moleküle aufweisen (Ghetie et al. 1996) wurde unabhängig von Brambells Beobachtungen (vgl. Kap. 1.2.1.2) vermutet, dass FcRn sowohl für den Antikörper-Transport als auch für die Kontrolle des Antikörper-Katabolismus notwendig ist (Medesan et al. 1997).

Passend zu dieser Hypothese fand sich FcRn- α -mRNA-Expression nicht nur im Darm neugeborener Mäuse, sondern auch in anderen Gewebearten, wie z.B. der Leber, Lunge, Milz und endotheliale Gewebe (Ghetie et al. 1996, Borvak et al. 1998), letzteres als wahrscheinlichstes, morphologisches Korrelat des Antikörpermetabolismus (vgl. Kap. 1.2.1.7).

Die für die FcRn-Bindung kritischen Aminosäuren des IgG1-Moleküls wurden zunächst für die Maus (Medesan et al. 1996 und 1997), später auch für den Menschen (Kim et al. 1999) molekulargenetisch dargestellt und beschrieben.

Mit Hilfe gentechnischer Methoden wurden IgG1-Varianten erzeugt, die sich in den, für die FcRn-Bindung relevanten Aminosäuren unterschieden und pH-abhängig unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu humanem FcRn aufwiesen (Dall'Acqua et al. 2002); auch hFcRn-Varianten mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu mIgG wurden generiert (Zhou et al. 2003).

Dabei bestätigte sich, dass sich die für die Interaktion der IgG-Moleküle mit FcRn wichtigen Aminosäuren beim Menschen wie bei der Maus in der CH2-CH3-Schnittstelle des IgG-Moleküls befinden und dass Histidin-Aminosäuren in diesem Bereich für die pH-abhängige Bindung zu FcRn zuständig sind (Medesan et al. 1997, Kim et al. 1999, vgl. Kap. 1.2.1.4 u. Abb. 2).

1.2.1.6.2 Zell-Studien

Anhand verschiedener Zell-Modelle wurde der FcRn-IgG-Transport-Mechanismus weiter erforscht und dargestellt:

Mittels vom humanen Chorionkarzinom abstammenden, syncytioblastischen Zellen ähnelnden BeWo-Zellen zeigte sich auf mikroskopisch-zellulärer Ebene, dass IgG zunächst in gelöster Form endozytotisch aufgenommen und später, in azidifizierten Endosomen, intrazellulär an den FcRn-Rezeptor, der den IgG-Liganden so vor dem Abbau „rettet“ (= „salvage“-Funktion), gebunden wird (Ellinger et al. 1999).

Eine Über-Expression der FcRn- α -Kette führte im selben Zellmodell zu einer verstärkten Retention und endosomalen Anreicherung des ansonsten sezernierten FcRn-Bestandteils β 2-Mikroglobulin (Ellinger et al. 2005), was die Dimerisation beider Moleküle zum Rezeptor-Heterodimer bestätigte.

Bidirektionaler, pH-abhängiger, vesikulärer IgG-Transport zeigte sich auch in FcRn- α -Ketten-transfizierten Ratten-Nieren-Zelllinien (IMCD) (McCarthy et al. 2000).

In von Nierenepithelien des Hundes abgeleiteten, FcRn-transfizierten, „polarisierten“ MDCK - („Madin Darby canine kidney“) Zellschichten wurden IgG-Moleküle von FcRn-Rezeptoren sowohl von der apikalen zur basalen Oberfläche, wie auch in umgekehrter Richtung transportiert (Praetor et al. 1999, Yoshida et al. 2004).

Im selben Zellmodell fand sich eine FcRn-Verteilung überwiegend apikal-intrazellulär und basolateral auf der Zelloberfläche („basolaterales sorting“), was Di-Leucin- und

Tryptophan- basierten Endozytose-Motiven im zytoplasmatischen Anteil der FcRn- α - Ketten zugeschrieben wurde; als treibende Kraft für den bidirektionalen Transport wurden dabei externe Konzentrationsgradienten, wie der pH-Wert oder die IgG- (Liganden-) Konzentration angenommen (Claypool et al. 2004).

Fc γ -Rezeptor-Chimären, die den zytoplasmatischen Anteil von FcRn beinhalteten, verteilten sich in MDCK-Zellen in FcRn-typischer Weise an die apikale und basolaterale Zelloberfläche, internalisierten und transportierten IgG-Moleküle, wobei das enthaltene Di-Leucin-Motiv der schnellen und effizienten Endozytose diente (Stefaner et al. 1999).

„Live-Cell-Imaging“ mit grün-fluoreszierendem FcRn in FcRn-transfizierten Endothelzellen zeigte endosomale FcRn-IgG Bindung im „sorting-endosome“ und lieferte damit ein dynamisches Zell-Modell für den FcRn-Rezeptor, wodurch sich der Prozess der Exozytose von IgG, seine Zell-Aufnahme und –Freisetzung sowie das intrazelluläre „trafficking“ mit Relevanz für die IgG-Homöostase auf mikroskopischer Ebene beobachten und nachvollziehen ließ (Ober, Martinéz, Vaccaro et al. 2004, Ward et al. 2005).

Verschiedene Formen der IgG-Exozytose wurden anhand letzterem Zell-Modell als „complete fusion“ (komplette Fusion der Vesikel mit der Zellmembran), „kiss and run“ (partielle Fusion), „prolonged release“ und „complex kiss-and-run and vesicle recycling“-Modi unterschieden (Lencer & Blumberg 2005).

Weitere, mikrozelluläre Mechanismen des IgG-Transportes wurden identifiziert und dabei beobachtet, dass sich einzelne Schritte des FcRn-vermittelten IgG-Transports und des IgG-Recyclings mikrostrukturell unterscheiden lassen (Tzaban et al. 2009).

1.2.1.6.3 Studien am Tiermodell

Um die Funktion des FcRn-Rezeptors in vivo zu untersuchen, experimentierte man mit β 2m- und FcRn- α -Ketten-knockout-Mäusen, da beide Proteine Bestandteile des FcRn-Rezeptors darstellen (vgl. Kap. 1.2.1.3 u. 1.2.1.6.2):

Anhand von β 2m-knockout-Mäusen zeigte sich, dass diese kaum perinatale, intestinale FcRn-Expression und wesentlich niedrigere IgG-Spiegel aufwiesen und auch kein IgG über die Muttermilch erwarben, was als Nachweis der Bedeutung des Rezeptors beim IgG-Transport sowie bei der IgG-Homöostase interpretiert wurde (Israel et al. 1995).

β 2-Mikroglubulin-knockout-Mäuse zeigten auch einen 10-fach höheren IgG-Katabolismus und Verlust des „differentiellen-Katabolismus-Phänomens“, der

beschreibt, dass Antigene in Gegenwart von IgG langsamer verstoffwechselt werden (Junghans & Anderson 1996, vgl. Kap. 1.2.1.8.3d).

Neugeborene FcRn- α -Ketten-knockout-Mäuse (FcRn^{-/-}, FcRn^{+/-}) zeigten deutlich niedrigere IgG- und Albuminspiegel, keinen, bzw. einen um die Hälfte reduzierten, perinatalen Antikörper-Transport und beschleunigten IgG-Abbau, woraus u.a. geschlossen wurde, dass beide Kopien des FcRn-Gens für den vollständigen IgG-Transport erforderlich sind (Roopenian et al. 2003, Kim et al. 2009).

[Hierbei bestätigte sich, dass der FcRn-gesteuerte IgG-Transport bei Mäusen ausschließlich über den Dottersack (entodermal) und nicht, wie beim Menschen, über die Chorio-allantoische Plazenta (mesodermal) geschieht; FcRn war hier auch in murinen plazentaren Endothelien nicht nachweisbar (Kim et al. 2009, vgl. Kap. 1.2.2.1)].

Mittels IgG-Varianten unterschiedlicher Bindungsaffinität zu FcRn wurde die Bedeutung von FcRn beim Antigentransport zu Antigenpräsentierenden Zellen (APC) anhand von konsekutiver T-Zell Proliferation in Mäusen nachgewiesen (Mi et al. 2008, vgl. Kap. 1.2.1.8.4a).

Die zentrale Bedeutung des FcRn-Rezeptors bei der Pathogenese der FNAIT konnte eindrucksvoll anhand von β 3-Integrin- und FcRn-defizientem Maus-Modellen gezeigt werden (Chen et al. 2010).

1.2.1.7 Vorkommen u. Gewebenachweis des Rezeptors

(diese Darstellung hat vorläufigen Charakter und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit; der Autor möchte lediglich einen Einblick in die Vielfalt und Komplexität der Studienlage vermitteln)

1.2.1.7.1 Proteinnachweis von FcRn

Die schwerere FcRn- α -Kette wurde IgG-affinitätschromatographisch aus dem Darm von Ratten isoliert (Rodewald 1976, Simister & Mostov 1989).

Mittels Maus-anti-Ratten-FcRn-Antikörpern wurde der FcRn-Rezeptor aus dem Dottersack der Ratte isoliert (Roberts et al. 1990).

Immunhistochemisch wurde FcRn im Dottersack der Ratte (Roberts et al. 1990), auf Leberzellen der Ratte (Blumberg et al. 1995), adulten und fetalen, menschlichen Darmepithelien (Israel et al. 1997; Shah et al. 2003), menschlichen Nierenglomeruli (Haymann et al. 2000), menschlichen Monozyten u. Gewebe-Makrophagen (Zhu et al. 2001), auf murinem (Cianga et al. 1999) und humanem Brustdrüsengewebe (Cianga

et al. 2003), auf murinen endothelialen Zelllinien (Ghetie et al. 1996, Borvak et al. 1998), auf humanen, plazentalen, endothelialen Zelllinien (HPEC; Gafencu et al. 2003), am humanen Syncytiotrophoblasten (Leach et al. 1996), auf menschlichen Alveolen sowie Mensch-, Affen- und Mausbronchialepithel (Spiekermann et al. 2002) nachgewiesen.

Ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen humanes FcRn detektierte FcRn außerdem auf Choriocarcinom-Zelllinien, hepatogenen Zelllinien (HEPG2), endothelialen Zelllinien, epithelialen Zelllinien der Lunge und Niere sowie auf primärem Endothel der Nabelschnur (de Haas 2001).

Ein Nachweis durch Western-blots erfolgte u.a. an menschlichen, intestinalen Makrophagen, Blut-Monozyten u. dendritischen Zellen (Zhu et al. 2001), adulten, humanen, intestinalen Epithelzellen (Shah et al. 2003) sowie humanen, Affen- und Maus-Lungenepithelien (Spiekermann et al. 2002).

1.2.1.7.2 RNA-Nachweis des FcRn-Rezeptors

Northern blots zeigten FcRn-RNA im Dünndarms neugeborener sowie in Hirn-, Herz-, Niere-, Leber-, Pankreas- u. Milzgewebe ausgewachsener Ratten (Simister & Mostov 1989), dem Dünndarm neugeborener und dem Dottersack fetaler Mäuse (Ahouse et al. 1993) sowie der humanen Plazenta, Herz, Hirn, Lunge, Leber, Skelett, Muskel, Niere, Pankreas (Story et al. 1994), menschlicher Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Zhu et al. 2001).

In-situ-Hybridisierung humaner FcRn-RNA gelang im Syncytiotrophoblasten, ein plazentarer, endothelialer Nachweis gelang hier jedoch nicht (Simister & Creighton Ahouse 1996).

Mittels Reverser Transkriptase wurden FcRn-RNA-Transkripte in Leberzellen ausgewachsener Ratten (Blumberg et al. 1995) und in humanen Nieren-Glomeruli nachgewiesen (Haymann et al. 1999).

Durch real-time-PCR gelang der Nachweis von humaner mRNA in Choriocarcinom-Zelllinien, die synzytiotrophoblastischen Zellen ähneln, hepatogenen Zelllinien (HEPG2), endothelialen Zelllinien, epithelialen Zelllinien der Lunge und Niere sowie primärem Endothel der Nabelschnur (de Haas 2001).

1.2.1.7.3 indirekter, funktioneller FcRn-Nachweis:

Indirekt wurde FcRn u.a. mittels, in ihrer Bindungsregion zu FcRn mutierten Antikörpern (vgl. Kap. 1.2.1.6.1), immunhistochemisch am extrakorporal-perfundierten

Plazenta-Modell (Leach et al., vgl. Kap. 1.2.2.2) sowie durch knockout-Studien am Tiermodell nachgewiesen (vgl. Kap. 1.2.1.6.3).

Ein weiterer indirekter Nachweis von FcRn gelang mittels IgG-Epo-Fusionsproteinen auf Lungenepithelien der Maus (Spiekermann et al. 2002, vgl. Kap. 1.2.1.8.3a).

1.2.1.8 Funktionen des FcRn-Rezeptors

Erforscht und diskutiert wurden (und werden) folgende FcRn-Funktionen:

1.2.1.8.1 IgG-Transport über Epithelgewebe

Hier interessierte zunächst speziell die „maternofetale Weitergabe“, bzw. treffender, der „fetomaternalen Erwerb“ von IgG-Antikörpern als dem Haupt-Träger passiver Immunität (Brambell et al. 1954, Junghans 1997, Ghetie & Ward 2000, Roopenian et al. 2003, Baker et al. 2009, Chen et al. 2010):

Diese erfolgt beim Menschen, Meerschweinchen, Kaninchen und Primaten primär pränatal über die Plazenta bzw. den Dottersack, bei Wiederkäuern, Pferd u. Schwein neonatal über die Muttermilch und den Darm des Neugeborenen, bei Mäusen, Ratten u. Fleischfressern (Hund, Katze) sowohl prä- als auch neonatal (Junghans 1997, s. Tab. 1). Auch beim Menschen fanden sich jedoch Hinweise auf prä- bzw. neonatalen Antikörper-Transport über den Darm (Israel et al. 1997, Shah et al. 2003).

Tabelle 1: speziesspezifischer, aktiver „Erwerb“ passiver Immunität (nach Junghans, 1997)

Spezies	Zeitliche Einordnung der IgG-Weitergabe	
	antenatal	neonatal
Kaninchen, Meerschweinchen, Primaten, Menschen	++	-
Wiederkäuer (Rind, Schaaf), Pferd, Schwein	-	+++
Maus, Ratte, Fleischfresser	+	++

1.2.1.8.2 Regulation der IgG-Homöostase im menschlichen und tierischen

Organismus

(Brambell et al. 1964, Junghans 1997, Ghetie & Ward 2000, Roopenian et al. 2003, Ward et al. 2003, Baker et al. 2009, Chen et al. 2010, vgl. Kap. 1.2.1.2 u. 1.2.1.6.1):

Als wahrscheinlichste Rezeptor-Lokalisation zur Ausübung dieser Funktion gelten die Endothelzellen (Junghans & Anerson 1996, Baker et al. 2009, vgl. Kap. 1.2.1.6.1 u. 1.2.1.7).

Darüber hinaus wurde in diesem Zusammenhang eine Rolle des Rezeptors bei der IgG-Reabsorption (auch pathologischer IgG-Komplexe) an der Niere (Haymann et al. 2000) sowie beim Schutz vor dem Abbau in Leberzellen diskutiert (Telleman & Junghans 2000, vgl. Kap. 1.2.1.7).

1.2.1.8.3 Regulation der Albumin-Homöostase

FcRn-knockout Mäuse zeigten ein gleichermaßen pH-abhängiges Bindungs- und Konzentrations-Katabolismus-Verhalten für Albumin wie für IgG, was Anlass zur Hypothese gab, dass Albumin in ähnlicher Weise wie IgG pH-abhängig an FcRn gebunden, transportiert, recycelt (Chaudhury et al. 2003, Baker et al. 2009) und an der Niere resorbiert wird (Haymann et al. 2000).

1.2.1.8.4 weitere immunologische Funktionen:

a) Wächterfunktion („immunosurveillance“) an Schleimhäuten mit Transport von luminalen Antigen-Antikörper-Komplexen an immunkompetente Zellen (Brambell 1963, Junghans & Anderson 1996, Israel et al. 1997, Zhu et al. 2001, Mi et al. 2008), beispielsweise im Darm (Shah et al. 2002, Yoshida et al. 2004) [mit Relevanz für die Entwicklung des Immunsystems (Baker et al. 2009)] sowie in der Lunge (Spiekermann et al. 2002).

b) Funktionen beim immunologischen Austausch zwischen parenchymalen Immunzellen der Leber und der Galle (Blumberg et al. 1995)

c) Induktion von oraler Immuntoleranz im Darm (Israel et al. 1997, Baker et al. 2009)

d) Protektion von Immunkomplexen für die Antigenpräsentation („differentieller Katabolismus“, Junghans & Anderson 1996, Zhu et al. 2001, Mi et al. 2008, vgl. Kap. 1.2.1.6.3)

e) Kolostrale und intestinale Immunglobulin-Sekretion zwecks intestinaler Immunabwehr säugender Huftiere (Kacs Kovics 2004).

f) Möglicherweise ist FcRn am intermolekularen Austausch von IgG4-Bestandteilen beteiligt (Aalberse & Schuurman 2002).

g) Beseitigung von IgG-Ablagerungen an Basalmembranen der Nieren-Glomerula (Hayman et al. 2000, Akilesh et al. 2008, Zhou et al. 2009).

1.2.2 Die Verhältnisse an der humanen Plazenta

Der maternofetale Transportweg von IgG bei Säugetieren variiert speziesspezifisch (Brambell et al. 1954, s. Tab. 2, vgl. Kap. 1.2.1.8.1); beim Menschen erfolgt er plazentar, überwiegend ab dem dritten Trimenon der Schwangerschaft über den Syncytiotrophoblasten (Hemmings & Brambell 1961, Ghetie & Ward 2000, Roopenian et al. 2003, Baker et al. 2009).

Alternativ dazu wurde auch die Amnion-Flüssigkeit diskutiert, die sich alle 3 Stunden erneuert und an deren Membranen ein intensiver Flüssigkeits- u. Substanztausch stattfindet, sodaß diese im 1. u. 2. Trimenon zum IgG-Transport beitragen könnte, wobei zunächst in die Amnionflüssigkeit transportiertes IgG schließlich über fetale Darmrezeptoren in den fetalen Kreislauf aufgenommen würde (Brambell et al. 1951, Shah et al. 2003).

Tabelle 2: spezies- und gewebespezifischer Transport von IgG-Antikörpern auf die nachfolgende Generation (nach Kristoffersen 1996)

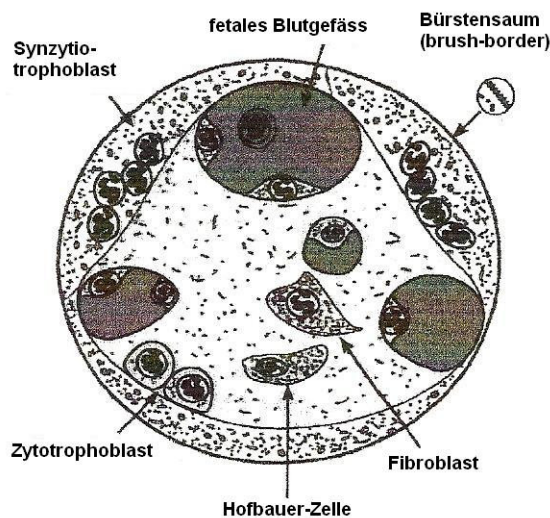
Spezies	Organ	
	pränatal	postnatal
Geflügel	Dottersack	Dottersack
Maus u. Ratte	Dottersack	Darm
Meerschweinchen	Dottersack	-
Stachelschwein	unbekannt	Darm
Hund	unbekannt	Darm
Mensch u. Affe	Plazenta	-
Pferd	-	Darm
Schwein	-	Darm
Wiederkäuer (Rind, Ziege,	-	Darm

Schaf)		
Känguruh (Wallaby)	-	Darm

Da Immunglobuline erst ab der 26. Schwangerschaftswoche in signifikantem Ausmaß vom mütterlichen in den fetalen Kreislauf gelangen, wurde vermutet, dass der Zytotrophoblast unterhalb des Syncytiotrophoblasten den IgG-Transfer blockiert (Doughty & Gelsthorpe 1976, Kristoffersen 2000).

Der Zytotrophoblast wandelt sich im Verlauf der Schwangerschaft in syncytiotrophoblastisches Gewebe, sodass die Barriere zwischen mütterlichem Blut und fetalem Kreislauf in terminalen Chorionzotten schließlich lediglich noch aus dem Syncytiotrophoblasten und fetalen Blutgefäß-Endothelzellen besteht (Abb.5).

Abb. 5: Querschnitt einer Chorionzotte im 3. Trimenon der Schwangerschaft (nach Kristoffersen, 1996)



Da die fetale Immunglobulinsynthese gering ist und das meiste IgG im fetalen Kreislauf von der Mutter stammt, der IgG-Spiegel des Neugeborenen den der Mutter jedoch oft sogar überschreitet, muss IgG aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden (Kristoffersen 1996, 2000).

Dass der Transport pathogener IgG-Antikörper am isoliert-perfundierten Plazenta-Lobulus-Modell durch hohe Dosen an IgG gehemmt werden konnte, wurde als Hinweis

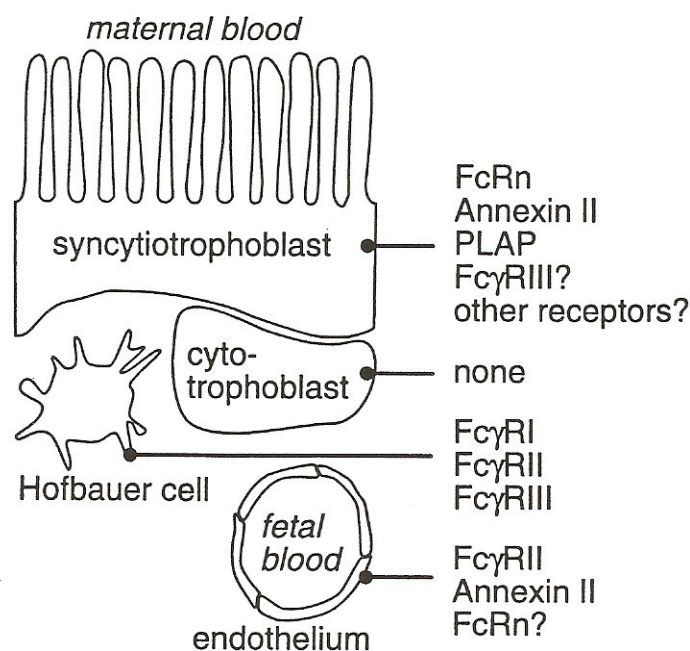
für die Beteiligung eines kompetitiv hemmbaren Antikörper-Rezeptors beim humanen, plazentaren IgG-Transport interpretiert (Urbaniak et al. 1997).

Als weiterer Hinweis für die Beteiligung eines spezifischen, plazentaren Transportrezeptors für IgG galt die Beobachtung, dass der IgG-Transport an der humanen Plazenta Immunglobulinsubklassen-spezifisch ist, wobei unter den IgG-Subklassen IgG 1 am effektivsten transportiert wurde (Simister 2003).

Immunelektronenmikroskopisch ließ sich ausschließlich IgG, jedoch keine anderen Immunglobuline in der Plasmamembran, in Vesikeln und größeren Granula des Syncytiotrophoblasten apikal, basal und innerhalb endozytotischer Vesikel der Endothelzellen nachweisen (Gafencu et al. 2002; Kristoffersen et al. 1996).

Für den IgG-Transport kamen zunächst verschiedene IgG-bindende Rezeptoren an plazentaren Epithelgeweben in Frage: Annexin II, Placental alkaline phosphatase und die leukozytären Fc γ -Rezeptoren FcRI, FcRII und FcRIII sowie FcRn (Kristoffersen 1996; Simister & Story 1997; Saji et al. 1999, s. Abb. 6).

Abb. 6: Plazentare IgG-Rezeptoren, die für den IgG-Transport in Frage kamen (nach Simister & Story 1997)



Der Nachweis von FcRn auf plazentaren Endothelzellen gestaltete sich zunächst schwierig, mit widersprüchlichen Ergebnissen (Kristoffersen et al. 1996, Simister & Creighton Ahouse 1996, Simister et al. 1996, Simister & Story 1997, vgl. Kap. 1.2.1.7):

1.2.2.1 Direkter, plazentarer FcRn-Nachweis:

FcRn wurde von humaner Plazenta isoliert, als Dimer aus der FcRn- α -Kette und β 2-Mikroglobulin identifiziert, immunhistochemisch im Syncytiotrophoblasten, im plazentaren Endothel sowie auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Leach et al. 1996), wobei die Studienlage zum direkten FcRn-Nachweis auf plazentarem Gefäßendothel insgesamt noch als unsicher zu bezeichnen ist (vgl. Saji et al. 1999, Kristofferson 2000, Lyden et al. 2001, de Haas 2001, Gafencu et al. 2003, vgl. Kap. 1.2.1.7). Letztgenannte Studie konnte FcRn auf isolierten, plazentaren Endothelzellen neben einem weiteren, „neuen“ Fc γ -Rezeptor nachweisen (Gafencu et al. 2003).

2001 wurde Fc γ RIIb2 als IgG-Transport-Rezeptor des villösen, plazentaren Endothels vorgeschlagen (Lyden et al. 2001), was jedoch von anderer Seite in Frage gestellt wurde (Simister 2003).

1.2.2.2 Indirekte, plazentare FcRn-Nachweise:

Am extrakorporal-perfundierten Plazenta-Modell ließ sich die Internalisierung von IgG anhand von HRP (horseradish-peroxydase)-markiertem IgG immunhistochemisch nachweisen, wobei sich IgG analog dem für FcRn postulierten Transportmechanismus zunächst an Microvilli gebunden und im Verlauf innerhalb von „coated pits“, in „coated vesicles“ bzw. „tubular-vesicular bodies“, in „multivesicular bodies“ und schließlich in basalen Vesikeln des Syncytiotrophoblasten darstellen liess (Leach et al. 1990).

In ihrer spezifischen FcRn-Bindungsregion mutierte IgG-Antikörper wurden im ex-vivo Plazenta-Modell (Firan et al. 2001) und in Zellkulturen humaner plazentarer Endothelzellen (HPEC; Radulescu et al. 2004) an einem Doppel-Kammer-IgG-Transport-System nicht transportiert, sondern dem lysosomalen Abbau zugeführt (vgl. Kap. 1.2.1.6.1).

β 2-Mikroglobulin, fester Bestandteil des FcRn-Rezeptors (vgl. Kap. 1.2.1.3), ließ sich immunhistochemisch in apikal-intrazellulären, plazentaren Zell-Granula nachweisen und mit IgG kolokalisieren (Kristofferson & Matre, 1996).

Ein pharmakokinetisches, kompetitives FcRn-Rezeptor-Mechanismus-basiertes Modell für die Autoimmunthrombozytopenie sagte im Tierversuch unter Verwendung von Rezeptor-depletierten FcRn-„knockout“-Mäusen das Konzentrationsverhalten

pathogener Anti-Plättchen-Antikörper, mit und ohne Verabreichung von IVIg voraus (Hansen et al. 2003). In einem FNAIT-Modell konnten an $\beta 3$ -Integrin- und FcRn-defizienten Mäusen die zentrale Bedeutung des FcRn-Rezeptors beim IgG-Transport eindrucksvoll nachgewiesen werden (Chen et al. 2010).

Auf mikrozellulärer Ebene ließ sich die IgG-Endozytose an FcRn-exprimierenden BeWo-Zellen, die vom humanen Chorionkarzinom abstammen, nachverfolgen (Ellinger et al. 1999, vgl. Kap. 1.2.1.6.2).

1.2.3 Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Wie einleitend bereits angedeutet wurde, dient die maternofetale Weitergabe von Antikörpern nicht in jedem Fall dem Wohl des Kindes. In bestimmten Fällen kann sie Krankheitswert erlangen, ein Beispiel dafür ist der MHN (Morbus haemolyticus neonatorum), ein zweites die alloimmune Neutropenie, das dritte, hier interessierende, die FNAIT (fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie) mit einer Inzidenz von ca. 1 / 1000 Neugeborenen (Bertrand et al. 2011):

Während sich beim MHN mütterliche Antikörper gegen die Erythrozyten des Kindes richten, sind bei der FNAIT die fetalen Thrombozyten betroffen: Der mütterliche Organismus bildet IgG-Antikörper, die die Plazenta passieren und in den fetalen Kreislauf gelangen können, gegen Proteine auf fetalen Thrombozyten.

Da durch die Verbesserung der Rhesusprophylaxe mittels Anti-D-Antikörper die Häufigkeit des MHN stark abgenommen hat, gewann die FNAIT als nicht seltene Erkrankung mit einer beträchtlichen Komplikationsrate, immer mehr an Interesse (Kiefel et al. 1994).

Die häufigste Ursache für mütterliche Immunisierung gegen fetale Thrombozyten ist das HPA-1-a-System, wobei die unterschiedlichen Phänotypen auf SNPs (single nucleotide polymorphism) innerhalb dieses Systems zurückzuführen sind. Klinisch kann es in 7 % bis 26 % der unbehandelten Fälle zu zerebralen Blutungen der Neugeborenen mit in 1/3 der Fälle letalem Ausgang kommen (Mueller-Eckhardt et al. 1989, Skogen et al. 2009). Die Alloimmunisierung ist dabei zu ca. 90 % mit dem HLA-DRB3*0101-Allel assoziiert, jedoch immunisieren sich nur ca. 30 % der HPA-1a negativen Mütter mit diesem Allel (Williamson et al. 1998).

Die Immunisierung der Mütter geschieht durch den Übertritt von Bestandteilen kindlicher Thrombozyten in den mütterlichen Kreislauf (Kiefel et al. 1994). Die Immunisierung der Mütter scheint dabei, ähnlich wie beim MHN, meist erst während bzw. nach der Geburt (peripartal) und nur zu einem geringen Prozentsatz bereits

während der ersten Schwangerschaft aufzutreten (Kiefel et al. 1994, Skogen et al. 2009). Eine neuere Studie, die auch für Erstgeborene ein hohes Erkrankungsrisiko feststellte (Bertrand et al. 2011) wurde von anderer Seite in Frage gestellt (Sachs et al. 2011).

Haupthindernis für ein pränatales Screening war bisher das Fehlen verlässlicher Parameter für ein Blutungsrisiko der Feten (Skogen et al. 2009).

Zum Zusammenhang zwischen der Konzentration pathogener Antikörper im mütterlichen Serum und dem Erkrankungsrisiko der Feten gab es zunächst widersprüchliche Studienergebnisse (Proulx et al. 1994, Kurz et al. 1999), wobei neuere Studien wieder eine Korrelation beider Größen nahe legten (Skogen et al. 2009, Bertrand et al. 2011).

Beim MHN kam den Antikörper-Subtypen IgG1 und IgG 3 die größte Bedeutung für eine Voraussage über den Schweregrad der Erkrankung zu (Garner et al. 1995), während sich bei der NAIT keine Rückschlüsse von der Antikörper-Isotyp-Zusammensetzung im mütterlichen Serum auf den Schweregrad der Erkrankung ziehen ließen (Proulx et al. 1994).

Um die Unsicherheiten bei der Vorhersage anhand von maternalen, pathogener Antikörperkonzentration zu erklären, wurden verschiedenen Mechanismen diskutiert, darunter eine unterschiedliche, plazentare IgG-Transprotrate aufgrund Polymorphismen beteiligter Transportrezeptoren (Dooren & Engelfriet 1993, Hadley 1998, de Haas 2001, Chen et al. 2010, vgl. Kap. 1.1).

Die zentrale Bedeutung des FcRn-Rezeptors bei der Pathogenese der FNAIT konnte in letztgenannter Studie eindrucksvoll anhand von $\beta 3$ Integrin- und FcRn-defizienten Mäusen gezeigt werden (Chen et al. 2010, vgl. Kap. 1.2.2.2).

Therapeutisch wird die FNAIT mit fetalen bzw. neonatalen Blutplättchentransfusionen, hoch dosierten Immunglobulin- (IV IgG) und Cortisongaben der Mutter behandelt (Kiefel et al. 1994, Murphy et al. 1994, Bertrand et al. 2011), wobei IVIgG (intravenös verabreichte, hochdosierte IgG-Immunglobuline) allein nicht ausreichend zu sein schien (Kiefel et al. 1994) und über eine optimale Therapie, bspw. über die notwendige therapeutische Dosis von IVIgG weiter diskutiert wird (Sainio et al. 1999, Berkowitz et al. 2006, Murphy & Bussel 2007, Rayment et al. 2011, Bertrand et al. 2011). IVIgG konnte den Transport schädigender Antikörper auch in vitro an einem isoliert-perfundierten Lobulus der menschlichen Plazenta reduzieren (Morgan et al. 1991). Die Wirkung von IVIgG erfolgt zumindest teilweise durch die Blockade der plazentaren FcRn-Rezeptoren (Chen 2010).

1.2.4 Potenzielle klinisch-therapeutische Bedeutung des FcRn-Rezeptors

1.2.4.1 Allo- und Autoimmunerkrankungen:

Kompetitive Hemmung von FcRn durch IVIgG oder monoklonale Antikörper mindert den Verlauf von Auto- und Alloimmunerkrankungen. Potenziell betrifft dies alle Auto- bzw. Alloimmun-Erkrankungen, bei denen Antikörper bei der Pathogenese eine zentrale Rolle spielen. Neben der Alloimmunthrombozytopenie kommen die Alloimmunneutropenie, den Morbus haemolyticus neonatorum, die Autoimmunanämie, Autoimmunthrombozytopenie, Morbus Basedow, Myasthenia gravis, Systemischer Lupus erythematosus, Rheumatoide Arthritis etc. in Betracht. Für einige dieser Erkrankungen liegen bereits Studien vor, hierzu einige Beispiele:

In einem Maus-Autoimmunthrombozytopenie-Modell (Hansen & Balthasar 2003) und in einem Maus-Rheumatoide-Arthritis-Modell (Akilesh et al. 2004) führte FcRn-Defizienz bzw. die Verabreichung von IVIg über FcRn-Sättigung zu einer verstärkten Clearance anti-thrombozytärer bzw. anti-arthritisgener Antikörper.

Eine orale Gabe von Immunglobulinen könnte über denselben Mechanismus (FcRn-Blockade) bei der nekrotisierenden Enterokolitis Neugeborener einen verstärkten Abbau autoaggressiver Antikörper bewirken (Shah et al. 2003).

Auch Steroide könnten bei Autoimmunerkrankungen durch down-Regulation der endothelialen FcRn-Expression zu einer verstärkten Autoantikörper-Clearance beitragen (Martín et al. 1993, Yu & Lennon 1999).

Darüber hinaus wurde spekuliert, dass FcRn auch eine Rolle beim gesteigerten Antikörper-Abbau im Rahmen der myotonischen Dystrophie, deren Gen-Defekt mit einer Trinucleotid-Wiederholungssequenz sich auf demselben Gen-Locus wie das FcRn-Gen (19q13.3) befindet, spielen könnte (Simister et al. 1996). Auch der Hyperkatabolismus bei familiärer, hyperkataboler Hypoproteinämie wurde in Zusammenhang mit einem partiellen, funktionellen FcRn-Mangel gebracht (Wani et al. 2006).

Da sich β_2 -Mikroglobulin-defiziente Mäuse resistent für bullöses Pemphigoid zeigten und β_2 -Mikroglobulin gleichzeitig FcRn-Bestandteil ist (vgl. Kap. 1.2.1.3), könnte FcRn auch bei diesem Krankheitsbild ein potentiell Ziel-Molekül pharmakotherapeutischer Interventionen darstellen (Liu et al. 1997).

1.2.4.2 Weitere klinische Bedeutungen des FcRn-Rezeptors

Aufgrund der zentralen Bedeutung von FcRn für die Pharmakokinetik von Immunglobulinen lassen sich neben den Allo- und Autoimmunerkrankungen weitere klinisch relevante, potentielle Anwendungsgebiete erschliessen:

So werden „therapeutische Antikörper“, deren Pharmakokinetik ebenfalls durch FcRn bestimmt wird, in einem breiten Spektrum von Erkrankungen verwendet und beispielsweise gegen Toxine, Krankheitserreger sowie solide und hämatologische Krebserkrankungen eingesetzt (Lobo et al. 2004). Modifizierungen in der Bindungsregion für FcRn stellen eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Halbwertszeit dieser Antikörper zu verändern (Presta 2008). IgG1-Antikörper mit veränderter Affinität zu humanem FcRn sind bereits synthetisiert (Shields et al. 2001) und eine veränderte Halbwertszeit (Pharmakokinetik) solcher „engineered IgG-antibodies“ in Primaten nachgewiesen worden (Hinton et al. 2004, Oganessian et al. 2009).

In ihrer FcRn-Bindungsregion modulierte, radiomarkierte, antikarzinogene Antikörper, die in der Diagnostik von Tumorerkrankungen eingesetzt werden, zeigten im Tiermodell ebenfalls eine verkürzten Halbwertszeit. Ihre klinischer Einsatz könnte daher mit einer gerigeren Strahlenbelastung für die Patienten und schnellerer Tumorklassifikation einhergehen (Kenanova et al. 2005).

Einen weiteren therapeutischen Nutzen stellen IgG-Fusionsproteine von Pharmazeutika (Epo, FSH) oder Impfstoffen mit IgG₁-Fc-Proteinen dar, die durch FcRn über die Lunge (Spiekermann et al. 2002) oder den Darm (Low et al. 2005) aufgenommen werden können und eine verlängerte Halbwertszeit im Organismus aufweisen. Dies stellt ggf. eine Alternative und Weiterentwicklung konventioneller Verabreichung von Arzneimitteln oder Impfstoffen dar (Spiekermann et al. 2002).

2 Material und Methoden

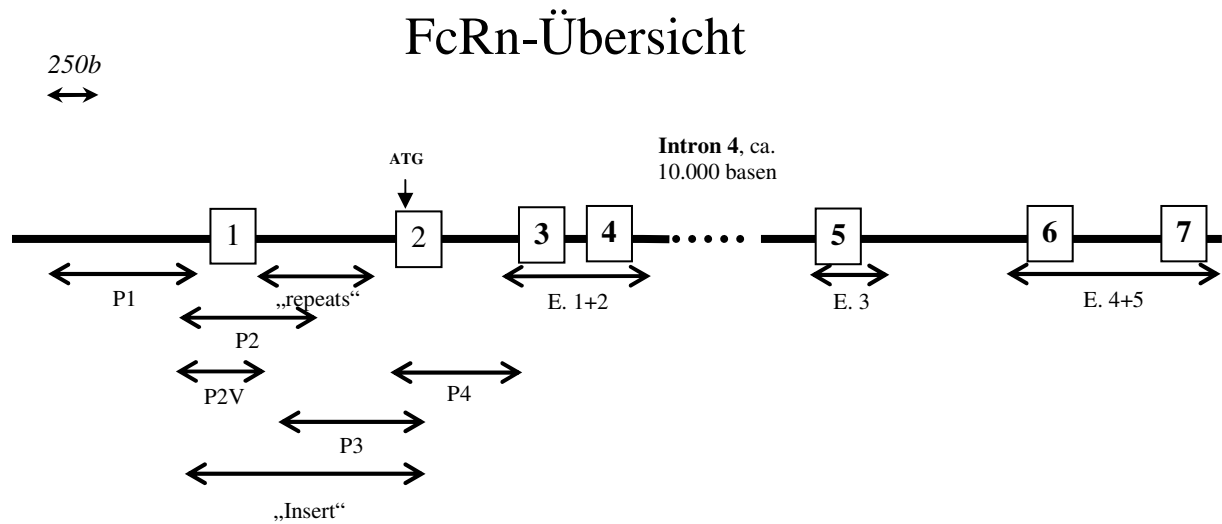
2.1 *DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut*

DNA aus Vollblut wurde mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit nach Herstellervorgabe isoliert. Die DNA wird dabei abhängig vom pH-Wert und der umgebenden Salzkonzentration reversibel an Silikatmembranen gebunden. Nach Lysierung der Zellen erfolgen mehrer Wasch- u. Zentrifugationsschritte, wodurch Proteine und Zellfragmente beseitigt werden. Die DNA wurde schließlich mit 200µl freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration photometrisch (Küvettenphotometer Spekol UV/VIS, Zeiss, Göttingen) gemessen.

2.2 *Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)*

Zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche wurde eine PCR mit jeweils 2,5 µl 5 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimern (s.Tab.4), 4 µl 1,25 mM each an freien Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Biotech, Martinsried), 0.5 µl 5 U/µl einer thermostabilen DNA-Polymerase (TaqGold Polymerase, Perkin Elmer, Massachusetts, USA), 100-200 ng genomischer DNA, 2,5 µl GeneAmp 10x PCR Puffer mit Aqua bidest. auf 25,0 µl Gesamtprobenvolumen durchgeführt. Die aus Denaturierungs-, Primer-Annealings- und Extensionsphase bestehenden Zyklen wurden 20 - 40 Mal wiederholt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Produkt mittels Agarosegel-Elektrophorese unter Zusatz von Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft (s.u.).

Abb. 7: Amplifikationsstrategie des FcRn-Gens, Gen-Darstellung in Anlehnung an Mikulska



waagrechte Pfeile: PCR-Amplifikate, vgl. Tab. 3 u. 4; nummerierte Quadrate 1-7: FcRn-Exone

Tab. 3: PCR-Produkte zur Sequenzierung des FcRn-Gens (vgl. Abb. 8)

PCR-Produkt	f-primer	r-primer
P1	P1	P1
P2	P2	P2
P2.5	P2	P2.5
P 3 prim. PCR I	P 3	P5
P 3 sek. (nested) PCR I	P3	P3
P 3 prim PCR II	P 3	P 3
P 3 sek. (nested) PCR II	P 5	P3
P4	P4	P4
„repeats“	„repeats“	„repeats“
„Insert“	P2 III	P3
E 1+2	E 1+2 V	E 1+2 R

E 3	E 3 V	E 3 R
E 4+5	E 4+5 V	E 4+5 R

Tab. 4: Bei der Amplifikation verwendete Primer, Basen-Zählung bezogen auf AF220542

f-primer	Position	Basenfolge
P1	FcRn911-931	5'-GGA ACT CGG ATA GAG GTG ACA-3'
P2	FcRn1512-1532	5'-TGA TTA ACA GCG AGC GCT AGG-3'
P2.III	FcRn1561-1581	5'-AGG AGG ATC CAG AGA CCT CCA-3'
P3	FcRn1972-1989	5'-TCT CGA CAC TGG GTC TGA-3'
P4	FcRn2431-2450	5'-AGG GCA TTG TTG TCA GTC TG-3'
P5	FcRn2021-2040	5'-TCT GAG AGA GGA GGG ACT GG-3'
"repeats"	FcRn1802-1820	5'-CAG GAT GTG AGA GAG GAA C-3'
E. 1+2 V	FcRn3001-3021	5'-GTC CCA CTG CAG TCT AGT TCC-3'
E 3 V	FcRn13489-13509	5'-GGA GGC CTC TTT CTG TCC CTA-3'
E. 4+5 V	FcRn14416-14438	5'-TTG GTG CTG GAA TCT CCG AGG CT-3'
r-primer		
P1	FcRn1619-1599	5'-ACT GGG AAA GGA ACT CGA TGC-3'
P2	FcRn2189-2169	5'-TCT ACC CTT GGA CCC AGG AGT-3'
P2.5	FcRn1897-1879	5'-CTC ACG TTC CCT TCA GCC T-3'
P3	FcRn2636-2619	5'-AGG AAG GAG AAA GAG CAG-3'
P4	FcRn3050-3031	5'-AAA CAG AGC TGA AGG GAG CA-3'
P5	FcRn2782-2761	5'-TTA ATT GAG CGG AGA AGG CAG C-3'
"repeats"	FcRn2368-2350	5'-CTT GAT AGG CTG AGA GTC C-3'
E. 1+2 R	FcRn3730-3710	5'-AAC TGA GGC AGG TGG GCA TGA-3'
E. 3 R	FcRn13901-13881	5'-GCA GCA GTG AGA CAA GGC AAC-3'
E. 4+5 R	FcRn15244-15224	5'-CAC AGC ATG AAA GGG GCC TGA-3'

Tab. 5: PCR-Bedingungen der einzelnen PCR-Produkte (vgl. Tab. 3 u. 4)

DNA-Framgment	Vorlauf		Lauf						Zahl der Zyklen	Nachlauf	
	T/°C	t /min	Denaturierung T/°C t/s		Annealing T/°C t/s		Elongation T/°C t/s			T /°C	t /min
E 1+2	96	10	95	60	60	60	72	60	32	72	10
E 3	96	10	95	60	60	60	72	60	32	72	10
E 4+5	96	10	95	60	60	60	72	60	32	72	10
P 1	96	10	95	60	59	60	72	60	32	72	10
P 2 (GC-richt kit)	96	10	95	60	57	60	72	60	32	72	10
P 2.5	96	10	95	60	58	60	72	60	32	72	10
P 3 prim. PcR I + II (Quiagen-Kit)	95	15	95	30	55	30	72	60	32	72	7
P 3 sek. PCR I (Quiagen-Kit)	96	15	95	30	52	30	72	60	32	72	7
P 3 sek. PCR II	96	15	95	30	50	30	72	60	32	72	7
P 4 (GC-rich Kit)	95	5	95	30	60	30	72	45	32	72	7
„repeats“(GC -rich kit)	96	10	95	30	52	45	72	45	32	72	10
„Insert“ (GC- rich kit)	95	5	95	30	58	30	72	55	30	72	7

Zur Amplifikation der PCR-Produkte P2, P4, „Insert“ sowie der FcRn VNTR-Allele („repeats“, vgl. Tab. 5) wurde jeweils eine PCR mit einem GC-RICH PCR-System (GC-RICH PCR System Roche, Penzberg) durchgeführt, das eine effiziente Amplifikation GC-reicher Sequenzen ermöglicht. 60ng genomische DNA wurde mit 0,5 µM allelspezifischen Vorwärts und Rückwärtsprimern, 0,2 mM dNTP's, 2,5 µl Lösungspuffer (Roche), 5 µl Reaktionspuffer (Roche) und 0,37 µl Enzym-Mix (thermostabile TaqDNA Polymerase, Roche) in einem Endvolumen von 25µl aufgenommen und unter den Bedingungen wie in Tabelle 5 angegeben auf einem GeneAmp PCR-system 9600 (Perkin Elmer) amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 1,5% Agarose-Gelen mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, Tris-Borat EDTA Puffer Gibco BRL, Karlsruhe) dargestellt und mit Hilfe des Nukleinsäuremarkers HAE III (Standard phiX174 DNA-Hae III Invitrogen, Karlsruhe) identifiziert.

Die Amplifikation des PCR-Produktes P3 erfolgte unter Anwendung des QIAGEN Multiplex PCR Kit für „schwierige“, GC-reiche Proben, wobei 5 µl PCR-Puffer und 10 µl Q-solution, 8 µl dNTP 1,25 mM each, je 3µl 5 µM Primerlösung und 0,3 µl Hot Start Polymerase eingesetzt wurden.

Aufgrund von Problemen bei der Amplifikation von P 2 und P 3 mit zu wenig PCR-Produkt oder nicht sichtbaren Banden im Kontroll-Gel bei P3 sowie rückwärts nicht sequenzierbarer P2-Produkte etablierten wir geschachtelte („nested“) PCRs (s.u.) sowie die weiteren PCR-Produkte „Insert“, P2.5 und „repeats“. Letztere eignete sich zur Darstellung der einzelnen VNTR-Allele (vgl. Kap. 3.2).

2.2.1 Geschachtelte („nested“) PCR

Aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten bei der Amplifikation von P2 und P3 wurden die PCR-Produkte P3 I + II durch geschachtelte PCRs jeweils aus primären PCR-Produkten (prim. PCR I und II, vgl. Tab. 3 und 5) gewonnen. Dabei wurde 5 µl PCR-Produkt der primären PCR in einer zweiten PCR eingesetzt, wobei jeweils ein bereits für das primäre Produkt verwendeter sowie ein weiterer Primer, der innerhalb des primären Produktes band, eingeführt wurde.

Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % igen Agarose-Gel aufgetrennt, isoliert (s. 3.1.11) und sequenziert (s. 3.1.12).

2.3 Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel

Zur Herstellung 1,5 % - 3 % ige Agarosegele wurde Agarose (Agarose Invitrogen, Karlsruhe) in Tris-Borat EDTA-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borat, 1 mM EDTA) gekocht, mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (Roche, Mannheim), einem in die DNA

interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, versetzt, in einen Gelschlitten mit Probenaschenkamm gegossen und unter Abkühlung polymerisiert. 10 µl DNA-Probe wurde mit je 2 µl Probenpuffer (Puffer erhöhter Dichte) gemischt, neben einem 1/10 verdünnten Molekulargewichtsstandard in die Probenaschen pipettiert und unter einer elektrischen Spannung von 100 V aufgetrennt. Die optische Darstellung erfolgte unter UV-Licht mittels eines Gel-Dokumentationssystems (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen).

2.4 PCR-Produkt-Aufreinigung

Um die PCR-Produkte nach einer Agarose-Gelelektrophorese zur späteren Sequenzierung aus dem Gel aufzureinigen, wurden die entsprechenden DNA-Fragmente zunächst unter UV-Licht mittels einem Skalpell (Feather Safety, Razor Co., Osaka, Japan) ausgeschnitten. Für die weiteren Aufreinigungs- und Konzentrationsschritte des PCR-Produktes wurde ein E.Z.N.A. Gel-Extraktions-Kit (QIAquick® PCR Purification Kit) nach Herstellervorgabe verwendet, wobei die polymerisierte Agarose mit dem PCR-Produkt zunächst gewogen, bei 50 °C solubilisiert, in QIAquick-Säulen pipettiert und die solubilisierte Agarose mittels einer Vakuum-Pumpe abgezogen wurde. Die an die Silikat-Matrix der Säule gebundene DNA wurde mehrmals gewaschen, durch Zentrifugation getrocknet und mit Wasser eluiert.

2.5 Natriumacetatfällung von DNA

Die Natriumacetatfällung erfolgte zur weiteren Aufreinigung und Einengung der markierten PCR-Produkte nach der Sequenzierungsreaktion (vgl. 2.6). Zunächst wurde 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) zum DNA-Lösungsvolumen gegeben und mit weiteren 80 µl Aqua dest. verdünnt. Daraufhin wurden 250 µl 100 %-igen, -20 °C kalten Ethylalkohols zugegeben und über 15 Minuten bei -4 °C und 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das DNA-Pellet in 250 µl 70 %-igem Ethylalkohol aufgenommen und weitere 5 Minuten bei 4°C, 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, das DNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge (Millipore, Moisheim, Frankreich) getrocknet und in 25 µl 20mM Tris-Puffer resuspendiert.

2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte anhand des ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

nach dem enzymatischen Kettenabbruchprinzip von Sanger. 1 µl (10-100 ng) des, wie unter 2.4 beschrieben aufgereinigten PCR-Produktes wurde mit 1 µl Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (siehe Tab.4, Kap. 2.3), 2 µl Big Dye™ und 14 µl aqua dest. für 25 Zyklen bei 96 °C 10 s, 50 °C 5 s und 60 °C 4 min inkubiert. Im Anschluß an diese PCR wurden die markierten DNA-Fragmente wie unter 2.5 beschrieben aufgereinigt. Die Auswertung mit der Detektion der Sequenzen erfolgte mittels ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.7 EDV- gestützter Sequenzvergleich

Die analogen Sequenzen der verschiedenen Individuen wurden mit dem GeneDoc2.7.0 (bio-soft.net)-Programm miteinander verglichen.

2.8 Restriktionsenzymverdau (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)

12 µl aufgereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µl NEB (new england biolabs) 2-Puffer, 1 µl unverdünntem Enzym (Bst U I) und 7 µl H₂O versetzt und bei 60 °C 12-16 h inkubiert und anschließend im Agarose-Gel dargestellt (vgl. 2.3).

2.9 Isolierung von Monozyten

Mononukleäre Zellen wurden aus dem buffy-coat (BC) frisch entnommenen Vollblutes gewonnen. Dazu wurden 3 x 20 ml BC mit je 30 ml PBS [Phosphate buffer saline (PBS) (1x), Gibco BRL, Karlsruhe] steril in 50 ml PS-Röhrchen (Falcon® (5 ml), BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) versetzt, auf 4 x 15 ml Ficoll-Paque™ (Ficoll-Paque™ PLUS, endotoxin tested Amersham, Buckinghamshire, UK) geschichtet und für 30 min bei 460 g, 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Interphasering (= PBMC, peripheral blood mononuclear cell – Layer) wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, in ein neues PS-Röhrchen überführt, mit D-PBS 0,1 % aufgefüllt und für 5 min bei 590 g, 20 °C zentrifugiert (Thrombozytenwaschschritt); der Überstand wurde verworfen und der letzte Waschschritt noch einmal bei 130 g, 5 min wiederholt. Die pelletierten Monozyten wurden zunächst direkt zur RNA-Isolation eingesetzt (vgl. 2.10). Im Verlauf der Arbeit wurden die Monozyten in sterilem PBS aufgenommen, am Durchflußzytometer (FACSCalibur™ Flow Cytometer, BD Bioscience, Heidelberg) gezählt, mit 1 x 10⁸ Zellen in 400 µl PBS mit 100 µl paramagnetischen anti-CD 14 Microbeads (MACS Microbeads (anti-CD14) Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) markiert und über Positivselektion (Programm „Pessel D“) mit dem automatischen

Zellsortierungsgerät (AutoMACS™, AutoMACSTM Separator Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) isoliert.

Die isolierten Zellen wurden erneut gezählt und zur RNA-Isolierung (Kap. 2.10) bzw. im Zelladhäsionstest (s. Kap. 2.19) eingesetzt.

2.10 RNA-Extraktion aus Monozyten

Zur RNA-Extraktion von Monozyten wurden 2 Methoden verwendet: Zunächst erfolgte eine RNA-Isolierung direkt nach der Monozyten-Isolation aus dem Monozyten-Pellet mittels des Roti®-Quick-Kits nach Herstellervorgaben, wobei das Monozyten-Pellet zunächst in 1 ml Lösung 1 resuspendiert und in 2 x 500 µl sterile RNA-Reaktionsgefäße [Safe Lock (1.5 ml, 2 ml), Eppendorf, Hamburg; 2. Sarstedt] überführt wurde (= Gip-Lysat). Nach Zugabe von je 650 µl Lösung 2 und mischen auf dem Vortex wurde der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 9600 g bei 4 °C zentrifugiert. Die obere, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Lösung 3 für nun 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, zu dem RNA-Pellet je 150 µl Lösung 1 und Lösung 3 zugeben, der Ansatz geschwenkt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Darauf wurde für 30 min bei 16200 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Der letzte Waschschrift wurde mit 1 ml 70 % Ethanol wiederholt, der Überstand verworfen, das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und anschließend für 10 min. in 30 µl RNase freiem Wasser (DEPEC-H₂O) gelöst. Die so gewonnene RNA wurde direkt in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 2.11).

Später wurde die RNA aus 5x10⁶ gezählt- und aufgereinigten Monozyten mit Hilfe des QIAgen RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorgaben isoliert. Nach Zelllyse und Proteindenaturierung wurde die Probe mit Ethanol versetzt und auf die Silikat-Gelsäule geladen. Durch die selektive Bindung von RNA an Silikatmembranen wurde die RNA von Protein- und Zellfragmentresten in mehreren Waschsritten getrennt. Die aufgereinigte RNA wurde mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei -70 °C bis zur cDNA-Synthese aufbewahrt.

2.11 RNA-Transkription in cDNA (in vitro Transkription)

Zur cDNA-Synthese wurde die isolierte RNA (1-5 µg) in 30 µl Wasser für 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die RNA-Lösung auf die Ready-To-Go First Strand Beads (Ready-To-Go™ Kit, Amersham, Buckinghamshire, UK) transferiert, 1 µl Random Primer pd (N)6 und 2 µl DEPEC-Wasser zugegeben, vorsichtig gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert.

2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA und RNA erfolgte mit dem NanoDrop® ND-2000 UV/VIS Spektralphotometer. Der Quotient aus E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Werte unter 1,8 deuten auf Proteinverunreinigungen hin, wobei DNA- und RNA nicht unterschieden werden können.

2.13 Quantifizierung *FcRn*-spezifischer Transkripte mittels TaqMan® Echtzeit PCR (Real-time PCR)

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels Echtzeit-PCR mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die PCR erfolgte unter Verwendung des Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Hierbei wurden 2 µl cDNA-Probe mit 2 µl SYBR Green, je 1 µl Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer, 2,4 µl MgCl₂ mit 11,6 µl H₂O auf 20 µl / Probenansatz verwendet. Die PCR erfolgte bei 50°C 2 min, 95°C 10 min, gefolgt von 40-50 Zyklen bei 95°C 15s, 60°C 1 min. 95°C 12 min, 95°C 0s, 64 °C 7s, 72°C 10s. Die Berechnung der relativen Änderungen der Genexpression erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001), PBGD wurde als Referenz-Gen verwendet (vgl. Tab. 6).

Tab. 6: in der Quantifizierungsreaktion verwendete Primer

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
FcRn	5' -CTT CGG TTC CTG CGG AAT-3'	5' -CGG TGG CTG GAA TCA CAT- 3'
PBGD ("house-keeping gene")	5'-CAC ACA GCC TAC TTT CCA AGC-3'	5' -GTA CGA GGC TTT CAA TGT TGC -3'

2.14 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 5-50 ng des zu vermehrenden Plasmids mit 100 µl DH5α kompetenten *E. coli* Zellen (DH5αTM, Qualität Maximum Efficiency, Gibco BRL, Karlsruhe) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es wurde ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad durchgeführt und die Bakterien anschließend für 2 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 900 µl S.O.C. Medium (Invitrogen) und einer 60 min Anzucht bei 37 °C im Schüttelinkubator wurden die Bakterien auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 1 % Bacto-Trypton, 1 %

NaCl, 100 µg/ml Ampicillin, pH 7,4) kultiviert. Zur Herstellung einer Glycerolkultur wurde 900 µl einer Bakterienkultur mit einer optischen Dichte von 0,4-0,6 (bei 600 nm) mit 100 µl Glycerin (87.5) versetzt und bei -80 °C in einem Kryogefäß aufbewahrt.

2.15 Renilla-Luciferase Reporter-Gen-Assay

Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität des FcRn Promotors wurde ein Renilla-Luciferase Reporter-Gen Assay (Dual-Luciferase® Reporter Assay, Promega, Mannheim) durchgeführt. In diesem System dient das Luciferase-Gen, das für ein Biolumineszenz hervorrufendes Protein (Renilla-Luciferase) kodiert und aus Seefedern stammt, als Reporter-Gen. Wird Luciferase in transfizierten Zellen als Reporter-Genprodukt produziert, kann die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch eine Biolumineszenzreaktion in den Zelllysaten gemessen werden. Die Renilla-Luciferase wandelt Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und Mg^{2+} in Oxyluciferin und CO_2 um. Bei dieser Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert, das in einem Luminometer (Berthold, Wildbach) gemessen wurde. Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge an Luciferase im Zelllysate ist, kann man direkt auf die Transkriptionsrate des Luciferase-Reporter-Genes schließen.

Es wurde ein Luciferase-Reporterplasmid unter transkriptioneller Kontrolle des FcRn Promotors generiert. Die putative FcRn Promotorregion von VNTR genotypisierten Individuen (VNTR 2 u. 3) wurde von Position -764 bis +1375 relativ zur ST1-Transkriptionsstelle ST 1 mit entsprechenden Primern (Primer P1 vorwärts u. P4 rückwärts, s. Tab 3 u. 4,) amplifiziert (s. Kap. 2.2) und die PCR-Produkte in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.3) isoliert.

Für die weitere Klonierung der VNTR-Allele wurden das FcRn Promotorfragment-Amplifikat und der Vektor geschnitten. Die Ligation wurde in einem Volumen von 10 µl durchgeführt, mit 50 ng geschnittener Vektor-DNA (1 µl) (Promega), 3 µl geschnittenes PCR-Produkt, 5 µl Rapid Ligation Premix 2x (Promega) und 1 µl Aqua über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zur Vermehrung und Analyse wurden 5-50 ng (2 µl Ligationsansatz) dieses Konstruktes in 50 µl transformationskompetente *E. coli* (DH5αTM) durch Hitzeschock transformiert (s. o.). Die transformierten Klone wurden auf Carbenicillin LB-Medium selektiert, vermehrt und die Plasmide über eine Midi-Präparation aufgereinigt und sequenziert (s.u.).

4-8x10⁵ U937-Zellen (Myeloische U937 Zellen: myeloleukämische Zellen eines 37-jährigen Kaukasiers mit diffusen, histiozytischen Lymphomen, American Type Culture

Collection, Wesel) wurden am Vortag der Transfektion auf 24-Lochplatten ausgesät und über Nacht in RPMI-Medium (RPMI 1640 mit L-Glutamin PAA Laboratories, Pasching, Österreich) mit L-Glutamin unter Zusatz von 10 % FKS (Fötales Kälberserum Gold, hitzeinaktiviert PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die anschließende Transfektion erfolgte mittels LipofektaminTM 2000 in serumfreiem Medium (Opti-MEM) entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen). Pro Ansatz wurden je 1 µl des Reporterkonstruktes und 1 µl des Firefly-Luciferase-Kontrollvektors pGL3 (Promega) kotransfiziert. In Parallelansätzen wurden U937 mit dem Kontrollvektor als positive Kontrolle (Promega) oder mit dem Reporterkonstrukt als negative Kontrolle transfiziert. Bei der hier benutzten kationischen Lipid-Methode bilden die Liposomen mit der DNA einen Komplex, der von den Zielzellen mit relativ hoher Effizienz aufgenommen wird.

Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, gewaschen, durch Zugabe von 100 µl PBL-Puffer 1x (Promega) von der 24-Loch-Platte gelöst und durch wiederholtes Einfrieren (Ethanol/Trockeneisbad) und Auftauen (Wasserbad 37°C) aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zellfragmente wurden 20 µl des Überstandes mit 100 µl des Luciferase-Substrates (LARII) (Promega) gemischt und die Firefly-Luciferaseaktivität sofort in einem Luminometer bei 562 nm Wellenlänge gemessen. Nach Inhibition der Firefly-Luciferaseaktivität durch Zugabe von 100 µl Stop&Go Reagenz (Promega) wurde die Aktivität der Renilla-Luciferase bestimmt.

2.16 Isolierung von Plasmiden aus Escherichia coli-Zellen

Zur Vermehrung rekombinanter Proteine in *E. coli* Zellen wurde eine 2 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Kolonie von frisch ausgestrichenen Bakterien oder einer Glycerolkultur angeimpft. Die Vorkultur wurde für 2 h bei 37°C geschüttelt, in 30 ml LB-Medium überführt und über Nacht im Schüttelinkubator (225 Upm 37°C) kultiviert.

Aus Übernacht-Kulturen mit einem Volumen von 30 ml wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Bakterienkulturen wurden pelletiert (6000 g, 15 min, 4°C) und in Anlehnung an das Herstellerprotokoll weiter aufgearbeitet. Nach Zellwandlyse in einem alkalischen Puffer (Qiagen) wurden durch Absenkung des pH-Wertes bakterielle Proteine und genomische DNA ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Diese wurde über eine selektive Bindung an mitgelieferte Anionenaustauschersäulen des Kits isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 90 µl DNase freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration bestimmt.

2.17 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck in Zellkulturgewebescheiden oder –flaschen. Die Standardbedingungen waren eine gesättigte Wasserdampfatosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert, bevor eine Kultur vollständige Konfluenz erreicht hatte.

Die myeloischen U937-Zellen wurden in RPMI-Medium mit L-Glutamin unter Zusatz von 10% FKS (Fötales Kälberserum Gold, hitzeinaktiviert PAA Laboratories, Pasching, Östereich) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Diese Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in Suspension gehalten und zweimal in der Woche in einem Verhältnis von 1 : 6 – 1 : 12 passagiert.

2.18 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Konfluent gewachsene Zellen einer Zellkulturschale wurden vor dem Einfrieren gewaschen, mit Accutase (Invitrogen, Karlsruhe) abgelöst und nach Zugabe von 5 ml frischem Medium abzentrifugiert (1200 Upm 5 min). Die Zellen wurden in 900 µl frischem, vorgekühltem Vollmedium resuspendiert, in eine Einfrierampulle mit 900 µl Einfriermedium (Vollmedium mit 20 % DMSO) überführt und für etwas 24 h bei – 70 °C eingefroren und danach im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Eingefrorene Zellen wurden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, bis nur noch eine geringe Menge Eis vorhanden war. Die Zellen wurden in 5 ml frisches, warm gestelltes Vollmedium aufgenommen, abzentrifugiert (240 g, 5 min), in 2 ml frischem Vollmedium resuspendiert und auf einer Zellkulturschale mit 7 ml Medium kultiviert.

2.19 Adhäsionstest mit mononucleären Zellen

Untersucht wurde die über den FcRn Rezeptor vermittelte Bindung der Monozyten an polyvalentes IgG in einem pH-abhängigen Adhäsionstest.

Humanes, polyvalentes IgG wurde in einer Konzentration von 3 µg/well oder PBS an eine Mikrotiterplatte für 2 h bei 37 °C adsorbiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurde nicht-gebundenes IgG entfernt. Mononukleäre Zellen wurden durch paramagnetische Zellseparation mittels AutoMACS® isoliert (s. Kap. 2.9). Die aufgereinigten Monozyten wurden in RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Östereich) auf eine Konzentration von 8x10⁶/ml eingestellt und das Milieu auf einen pH von 7,2, 6,5 oder 6,0 mit Essigsäure angesäuert. 8x10⁵ Zellen wurden je Vertiefung pipettiert und für 1 h bei 37 °C unter 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nicht-gebundene Monozyten wurden in 2 Waschschritten mit PBS (pH 7,2, 6,5 und

6,0) vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Zur Fixierung wurden IgG-gebundene Monozyten mit 150 µl einer eiskalten Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgekippt und die Mikrotiterplatte trocken geklopft. Zum Anfärben wurden 50 µl einer Kristallviolettlösung (0.5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, 79,5 % Aqua dest.) den Zellen zugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Leitungswasser wurde die Mikrotiterplatte gewaschen bis das Wasser klar war, getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl einer Messlösung (Methanol/Essigsäure/Aqua dest., Volumenverhältnis 4:1:5) wurde die Suspension in der Vertiefung leicht gemischt und die Intensität der Farbe photometrisch bei 592 nm gemessen.

2.20 Statistische Analysen

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis individueller, genetischer Unterschiede innerhalb der kodierenden Region des FcRn-Gens

Ich sequenzierte direkt die gesamte, kodierende Region des FcRn-Gens, wie in Abb. 1 gezeigt, anhand von 11 unverwandten Individuen.

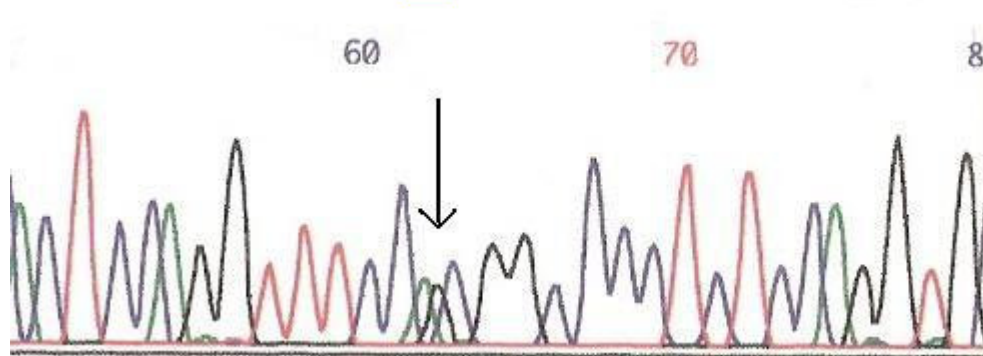
Das Ergebnis verglichen wir mit den publizierten DNA-Sequenzen (AF220542; Mikulska 2000), wobei ich mich bei der Basennummerierung auf die AF220542-Sequenz, bei der Nummerierung der Exone und Introne auf Mikulska beziehe.

3.1.1 SNP in AS 171 (C3646T)

Zwei Individuen erwiesen sich als heterozygot für eine stille Mutation C3646T in Exon 4 (resp. Exon 2 in AF220542) innerhalb der kodierenden Region für Aminosäure 171, der mit einem weiteren Basenaustausch T13850C in Intron 5 (resp. Intron 3) assoziiert war (s. Abb. 8 u. 9):

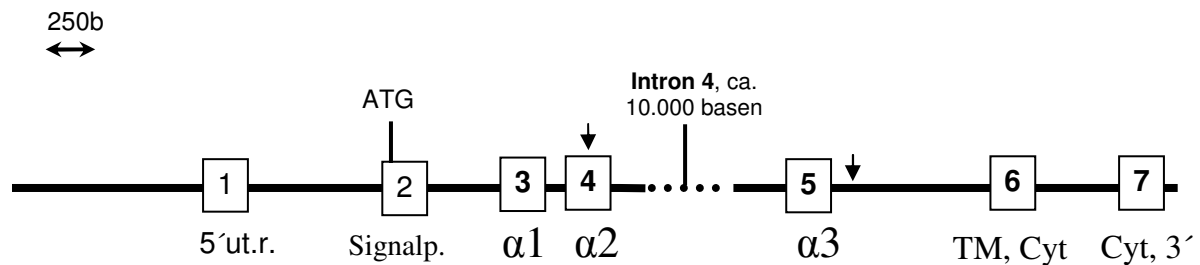
Abb. 8: SNP in Aminosäure 171, Exon 4, hier in 3'-5'- (rückwärts-) Richtung

A C T C C A G G T T T C C A G C G G C C C C T C T C C A G G T G



Pfeil: C3646T (hier: G-A) –Polymorphismus (CGT/C kodiert jeweils für Asparagin)

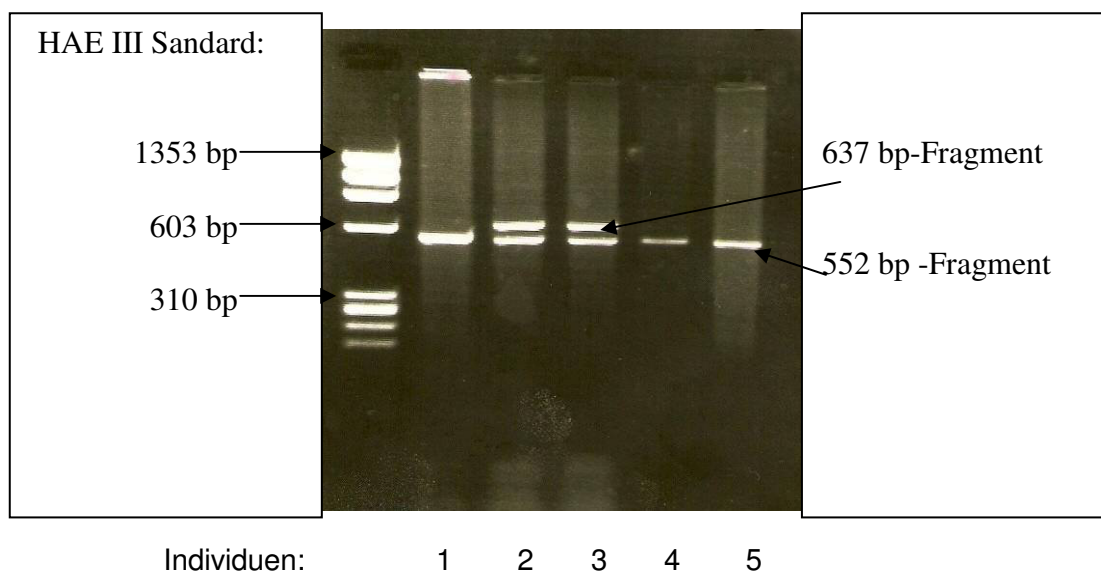
Abb 9: Darstellung der genomischen Struktur des FcRn-Gens nach Mikulska (Mikulska et al. 2000)



nummerierte Rechtecke: Exone; senkrechte Pfeile: Polymorphismen C3646T u. T13850C innerhalb der kodierenden Region von FcRn (Basennummerierung nach AF220542), ATG: Translations-Start-Kodon, vgl. Abb. 4, S. 13

Um Individuen einer Kohorte auf diese stille Mutation zwecks Bestimmung ihrer Häufigkeit untersuchen zu können, etablierte ich einen Enzymverdau des PCR-Produktes „E 1+2“ mit dem Restriktionsenzym BstU I (s. Abb. 10):

Abb. 10: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus in AS 171



Individuen 1, 4 u. 5 sind homozygot, Individuen 2 u. 3 heterozygot für den AS 171- C/T- Polymorphismus

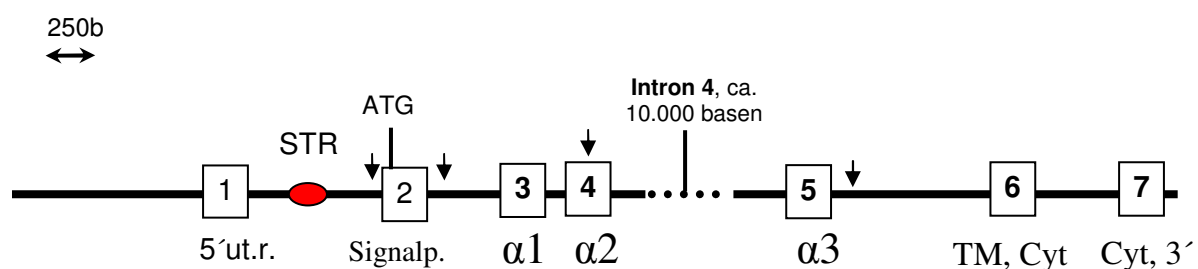
Mit diesem Verfahren typisierte ich ein Kollektiv von 100 anonymisierten Blutspendern. Hierbei fand ich unter den 100 Spendern 14 Heterozygote, entsprechend einer Genfrequenz von 7 %.

Da sich in meinen bisherigen Untersuchungen keine Mutation mit direkter Auswirkung auf der Aminosäureebene gefunden hatte, erweiterte ich meine vergleichende Sequenzanalysen auf die 5'-Promotorregion des FcRn-Gens, die das untranslatiertes Exon 1 und das Exon 2, das für das Signalpeptid kodiert, beinhaltet (Mikulska 2000).

3.2 Nachweis genetischer Variabilitäten in der Promotorregion des FcRn-Gens

Innerhalb der von mir sequenzierten Stichprobe fanden sich die zwei C3646T-heterozygoten Individuen gleichzeitig heterozygot an den Positionen T2401G und C2670T (SNPs = Single Nucleotide Polymorphisms) sowie heterozygot für eine VNTR (Variable Number of Tandem-Repeat) -Region in Intron 1 („Wiederholungsregion“, vgl. Abb. 11 u. 12). Diese Region besteht aus einem 37-Basenpaar-Motiv (Tab. 7) mit pro Basenstrang drei (VNTR3 = 111 Basen) bzw. 2 Wiederholungen (VNTR2 = 74 Basen) (s.u.) innerhalb einer Region ab Base 2080 (Basennummerierung nach AF220542, entspricht der Base 1290 bei Mikulska), die bereits als Chromosom 19-spezifische Minisatelliten-Region (MSR1) beschrieben wurde (Mikulska 2000).

Abb. 11: Wiederholungsregion (Minisatellit, „VNTR“) und Polymorphismen in der FcRn-Promotorregion, Gen-Darstellung nach Mikulska (Mikulska 2000)

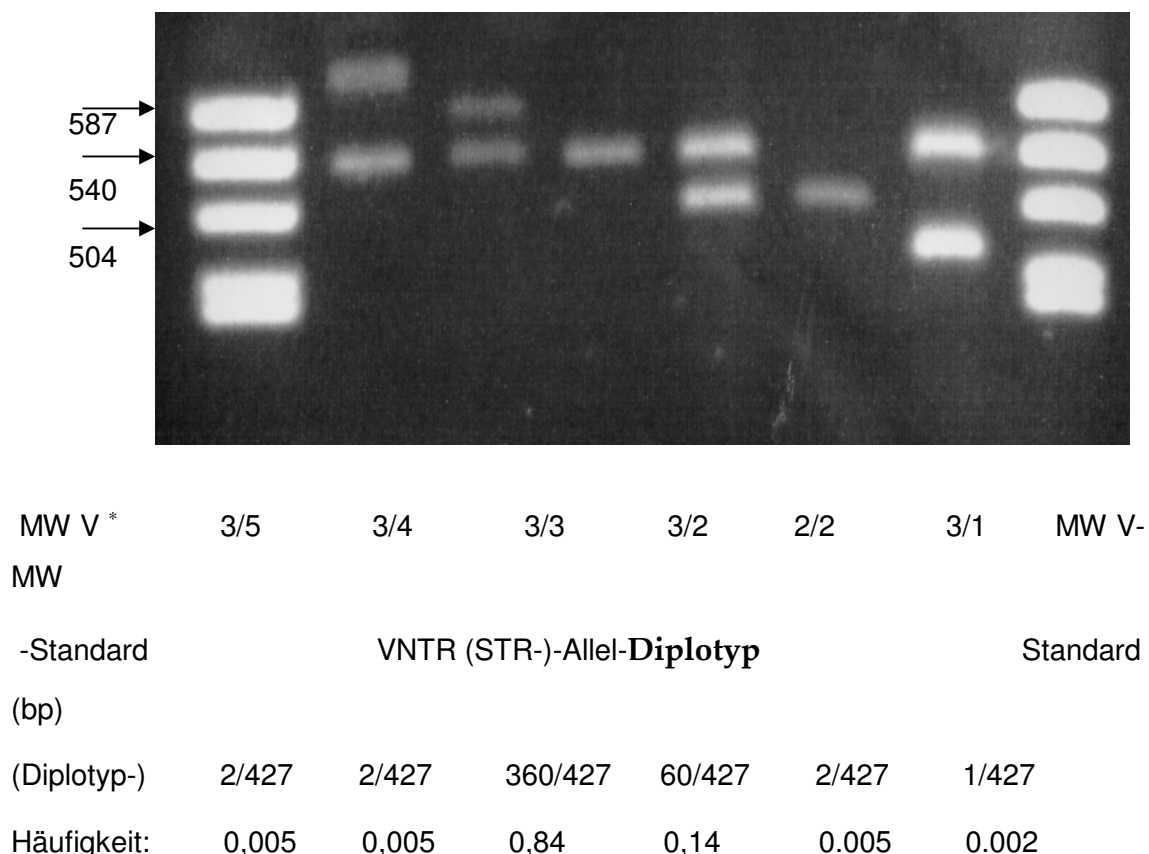


Rechtecke: Exone; STR: „short tandem repeat“-Region; senkrechte Pfeile: assoziierte Polymorphismen T2401G, C2670T, C3646T und T13850C (Basenzählung nach AF220542); ATG: Translations-Start-Kodon; vgl. Abb. 4, S. 13

3.2.1 Häufigkeit des VNTR-Polymorphismus

Diese Ergebnisse veranlassten mich, zunächst eine weitere PCR („repeats“, s. Material u. Methoden) zu etablieren, die aufgrund der VNTR-Genotyp-spezifischen Längendifferenz der PCR-Produkte von mindestens 37 Basenpaaren eine praktikable Unterscheidung der einzelnen VNTR-Genotypen erlaubt („repeats“-PCR, vgl. Kap. 2.1, Tab. 3-5). Mittels dieser PCR untersuchte ich erneut ein größeres Kollektiv von 427 anonymisierten Blutspendern auf weitere Genotypen dieser Region sowie auf deren Häufigkeit. Diese Genotypisierung dieser 427 unverwandten Individuen mittels VNTR-spezifischer PCR ergab fünf verschiedene Genotypen („VNTR 1-5“), die sich in der Länge der VNTR-Region jeweils um ein Vielfaches, passend zu einer 1-5-fachen Wiederholung des 37-Basen Motivs, voneinander zu unterscheiden schienen (Abb. 12):

Abb 12: „repeats“-PCR zur Darstellung der einzelnen Allele des VNTR-Polymorphismus in der Promotorregion des FcRn-Gens:



Die Sequenzierung einzelner Spender unterschiedlichen Genotyps bestätigte letztere Annahme, wobei sich die einzelnen Genotypen zusätzlich aufgrund von einzelnen Basenaustauschen innerhalb der Wiederholungssequenzen des 37-bp-Motivs (nach Motiv-Typ) unterschieden (Tab. 7 und 8):

Tab. 7: Wiederholungssequenz („repeat“):

Typ	Sequenz	SNP
1	5` cccggactcctgggtccgaggggaagagcggttggggg 3`	T,A
2	5` cccggactcctgggtccgagggtagagcggttggggg 3`	T,T
3	5` cccggactccgggtccgaggggaagagcggttggggg 3`	G,A

Tab. 8: Aufbau der einzelnen VNTR-Allele durch die Wiederholungssequenztypen

(vgl. Tab. 7)

Allel	Typ der Wiederholungssequenz in 5`-3`-Richtung, beginnend mit Position 2127 (resp. 1112, Mikulska et al.)	GenBank accession number:
1	1	AF453517
2	2,1	AF453516
3	2,2,1	AF453515
4	2,2,2,1	AF453514
5	1,1,3,1,1,	AF453513

Die Sequenzen der einzelnen Genotypen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern AF453513-AF453517 veröffentlicht (s. Tab. 8).

Die berechnete Genfrequenz für die fünf VNTR-Allele betrug 0,1; 7,5; 92,0; 0,2 und 0,2%, in der Reihenfolge steigender Anzahl der 37bp –Wiederholungsmotive VNTR1-5.

VNTR 3 ist mit 92 % der häufigste Genotyp bei Kaukasiern, VNTR2 mit 7,5 % der zweithäufigste. Alle anderen Allele sind selten (Tab. 9):

Tab. 9: errechnete Genfrequenzen (Häufigkeit) der definierten VNTR-Allele des FcRn-Gens:

VNTR-Allel	1	2	3	4	5	Summe
Anzahl (=Homozygot x 2 +Heterozygot)	1	64 (2*2+60)	785 (360*2 +1+60+2+2)	2	2	854 (⇔ 427 Individuen)
Haplotyp- Häufigkeit (Genfrequenz)	0,1 %	7,5 %	92 %	0.2 %	0,2 %	(Anzahl / 854 Allele)

3.2.2 Assoziation zwischen SNP in AS 171 und VNTR-Polymorphismus

Beim Vergleich der eingangs untersuchten AS 171-Genotypen mit den PCR-Ergebnissen der VNTR-Region zeigte sich, dass die Polymorphismen T2401G, C2670T, C13850T und C3646T mit dem VNTR-Allel 2 assoziiert vorliegen.

Der Vergleich meiner Sequenzierungen mit den bereits veröffentlichten Sequenzen (AF220542; Mikulska 2000) ergab, dass die Sequenzierung von Mikulska dem häufigsten VNTR-Allel 3 entspricht (wobei die in dieser Sequenz veröffentlichte Base Nr. 818 (T) in meinen Sequenzierungen fehlte), AF220542 dem seltenen VNTR-Allel 4 mit Differenzen zu meinen Sequenzen an den folgenden Positionen (Tab. 10):

Tab. 10: Vergleich meiner Sequenzierungen mit AF220542:

Position in AF220542	eigene Sequenzen (anhand von 16 Individuen)
2081(C)	nicht gefunden
2098(T)	C
2123(C)	G
2144(C)	G
2153(A)	G
2181(A)	G
zwischen Base 2256 und 2257:	G (fehlt in AF220542)
2313(C)	G

3.3 Monozytärer Nachweis differentieller FcRn-Transkription

3.3.1 quantitative Bestimmung der Rezeptor-Gen-Transkription *in vivo* anhand von monozytärer RNA

Um Auswirkungen des Genotyps des VNTR-Promotor-Polymorphismus auf die FcRn-Transkription zu untersuchen, verglichen wir die Menge monozytärer FcRn-RNA-Transkripte VNTR2- u. VNTR3-genotypisierter Blutspender.

Dazu isolierten wir zunächst monozytäre RNA von 10 VNTR-genotypisierten Blutspendern (je 5 VNTR 3/3-homozygot bzw. VNTR 2/3 heterozygot) und quantifizierte sie in Form von gewonnener, komplementärer cDNA mittels „real-time-PCR“ am „Light-Cycler“ mit FcRn-spezifischen Primern (s. Kap. 2.13).

Hierbei unterschieden sich die VNTR3-homozygoten (VNTR3/3) von den VNTR3-heterozygoten (VNTR2/3) Spendern statistisch signifikant (0.073 ± 0.01 vs. 0.045 ± 0.011 , $p = 0.002$, Mann-Whitney U-Test) in ihren $2^{-\Delta CT}$ Mittelwerten (vgl. Tab. 11).

Tab. 11: errechneter Gehalt an FcRn-m-RNA 10 FcRn-typisierter Monozytenspender; fünf Spender jeden Genotyps wurden untersucht und anhand der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) die Expression der FcRn-Transkripte quantitativ dargestellt:

Spender Nr.	STR Genotyp	ΔC_T	$2^{-\Delta C_T}$	MW $2^{-\Delta C_T} \pm$ STABW (p = 0.002)
1	3/3	3.73	0.0754	0.073 \pm 0.01
2	3/3	3.57	0.0842	
3	3/3	3.64	0.0802	
4	3/3	3.93	0.0656	
5	3/3	4.02	0.0616	
6	2/3	4.49	0.0445	0.045 \pm 0.011
7	2/3	4.34	0.0494	
8	2/3	4.36	0.0487	
9	2/3	4.16	0.0559	
10	2/3	5.18	0.0276	

Um die relative Zunahme des FcRn Transkripts in 5 homozygoten gegenüber 5 heterozygoten Spendern zu evaluieren, wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode angewandt (Livak and Schmittgen, 2001).

Dabei zeigte sich, dass Monozyten VNTR3-homozygoter Individuen das 1.66 Fache (95 % Konfidenzintervall: 1.28 - 2.04-fach) mehr an FcRn Transkripten im Vergleich zu denen VNTR3/VNTR2 heterozygoter Individuen exprimieren, d.h. , dass das VNTR3-Allel zu einer effizienteren, monozytären Transkription des FcRn-Gens führt als das VNTR2 Allel.

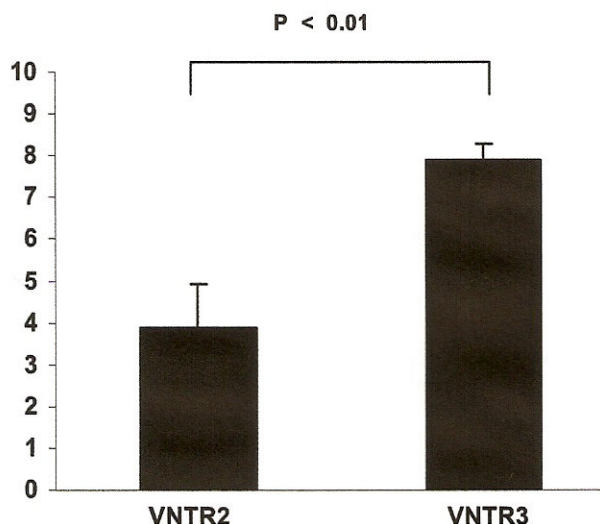
3.3.2 *in vitro*-Nachweis differentieller Transkriptionsaktivität der FcRn-Promotor-(VNTR)-Allele anhand von Reporter-Gen-Assays

Um diese Beobachtungen bestätigen zu können, wurden Reporter-gen-Plasmid-Assays mit Renilla-Luciferase Reporterplasmiden durchgeführt: Die mutmaßliche FcRn-

Promotor-Region, für die schon zuvor gezeigt worden war, dass sie die Transkription eines CAT-Reporter-Gens bewirkt (Mikulska & Simister 2000) wurde von Position -764 bis Position +1375 (bezogen auf die Transkriptions-Start-Position ST1) amplifiziert, die zwei häufigsten Allele VNTR3 (92%) und VNTR2 (7,5%) wurden in Renilla Luciferase Reporterplasmide kloniert, separat transient in myeloischen U937 Zellen exprimiert und ihre Fähigkeit zur Renilla Luciferase Reporter-Gen-Expression untersucht.

Die Renilla-Induktion jedes einzelnen Allel-Konstruktes wurde dabei jeweils doppelt von drei unabhängigen Transfektionen gemessen. Die Transfektionseffektivität wurde durch Ko-Transfektion mit Firefly-Luciferase-Vektor bestimmt (Abb. 13).

Abb. 13: Luminometrische Darstellung der Promotor-Aktivität anhand der Expression eines Luciferas-Reportergens unterschiedlicher FcRn-VNTR-Genotypen:



Y-Achse: relative Lichteinheiten (RLE): Die Transkriptionsaktivität des FcRn-Promoter-Allels VNTR 3 war signifikant höher als die von VNTR 2.

3.4 monozytärer Nachweis differentieller FcRn-Translation

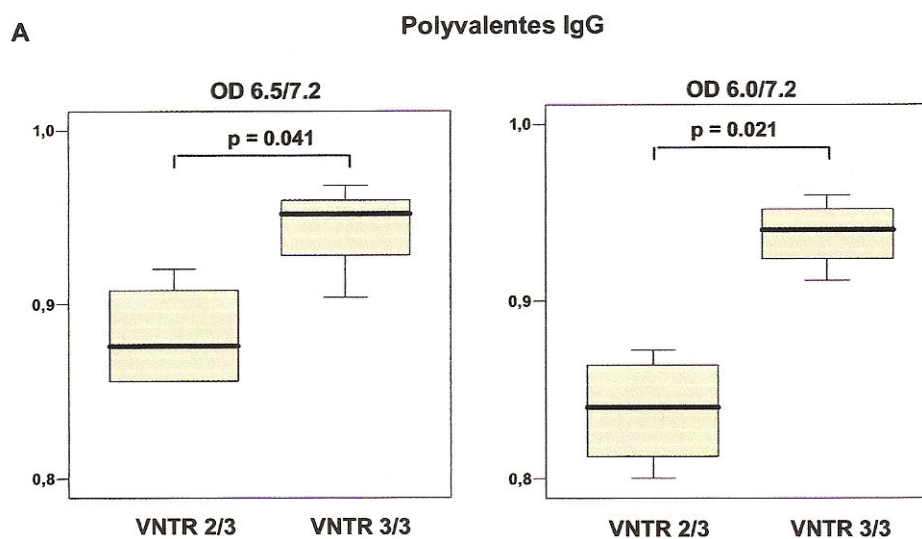
Da FcRn auf Zelloberflächen bei saurem pH IgG bindet (Rodewald & Kraehenbuhl, 1984; Simister & Mostov 1989), müsste, falls die oben gezeigte, unterschiedliche FcRn-Transkriptionseffektivität der Promotor-VNTR-Allele eine unterschiedliche FcRn-Translation und FcRn-Expression auf der Zelloberflächen zur Folge hat, der VNTR-Polymorphismus auch einen Einfluss auf die FcRn-abhängige IgG-Bindungskapazität dieser Zellen haben.

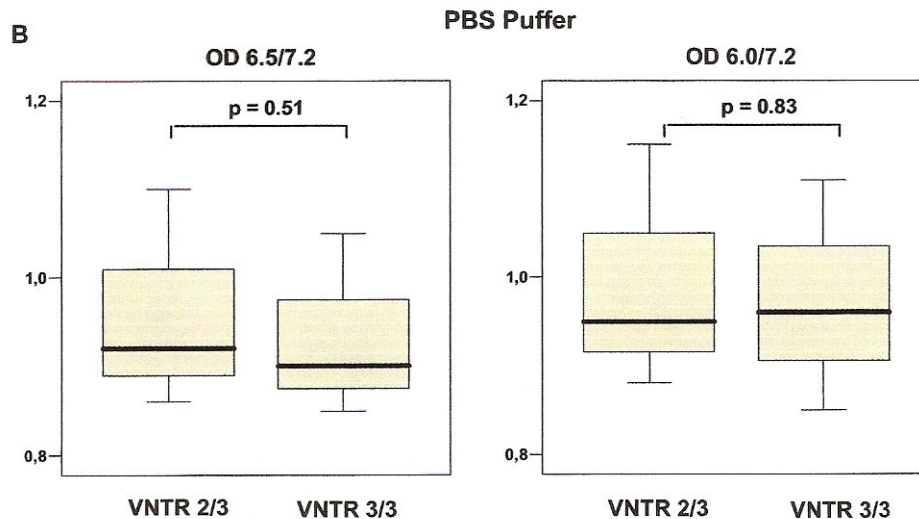
Daher wurde die Adhäsionsfähigkeit humaner Monozyten von VNTR3/3-homozygoten und VNTR 2/3-heterozygoten Spendern ($n = 4$ je Genotyp) an immobilisiertes, menschliches, polyvalentes IgG untersucht (Abb. 14).

Da die Affinität von FcRn zu IgG um ca. 2 Größenordnungen fällt, wenn der pH von 6,0 auf 7,0 angehoben wird (Raghavan, Bonagura et al. 1995), wurde die IgG-Bindungskapazität jeweils bei pH 6,5 und 6,0 gemessen.

Die ermittelten Werte wurden dabei auf die IgG Kapazität bei einem pH von 7,2 normalisiert, da in neutralem Milieu die IgG Bindung vorzugsweise durch andere IgG Fc γ -Rezeptoren erfolgt. Als negativ-Kontrolle diente die monozytäre Adhäsionsfähigkeit an PBS-Puffer.

Abb. 14: Affinität von Monozyten unterschiedlicher FcRn-VNTR-Diplotypen an IgG (A) bzw. PBS (negativ-Kontrolle, B) bei pH 6,5 und 6,0:





Es wurden Monozyten von je 4 VNTR3/3 bzw. VNTR2/3-Individuen isoliert. Zur Ermittlung der Adhäsion an immobilisiertes, polyvalentes IgG (A) bzw. an PBS als negativ-Kontrolle (B) wurden die Zellen bei einem pH von 6,5, 6,0 und 7,2 für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Kristallviolettffärbung wurde die Intensität photometrisch bei 562 nm gemessen.

Die Ergebnisse sind im Boxplot dargestellt. Die Mittellinie zeigt den Median, die untere und obere Begrenzung der Box die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Fehlerbalken kennzeichnen die minimalen und maximalen Extremwerte (VNTR = variable number of tandem repeats).

Humane Monozyten VNTR3/3-homozygoter Individuen zeigten schon bei pH 6,5 eine signifikant höhere IgG Bindung als die VNTR2/3-heterozygoter Individuen ($p = 0.041$).

Dieser Unterschied verstärkte sich noch bei pH 6,0 ($p = 0.021$) was aufgrund des pH-spezifischen FcRn-Bindungsverhaltens zu erwarten war.

4 Schlussteil mit Diskussion der Ergebnisse

Der neonatale Fc-Rezeptor, FcRn, ist nach derzeitiger Studienlage der zentrale Rezeptor des Immunglobulin G-Transportes sowie der IgG-Homöostase (Baker et al. 2009), es gibt jedoch erst wenig Information über die interindividuelle, genetische Variabilität des Rezeptors (de Haas 2001).

In der humanen Plazenta hat der Rezeptor die Funktion, IgG von dem mütterlichen in den fetalen Kreislauf zu transportieren (Kristoffersen 2000, Firan et al. 2001, Roopenian et al. 2003).

Ich verfolgte die Vermutung, dass genetische Polymorphismen des FcRn-Rezeptors in der Plazenta zu einem geringeren maternofetalen IgG-Transport führen (de Haas 2001) und so zu Unterschieden bei Ausprägung (Proulx et al. 1994, Kurz et al. 1999, Skogen et al. 2009) und Therapie (Sainio et al. 1999, Berkowitz et al. 2006; Murphy and Bussel, 2007) der FNAIT (fetale / neonatale Alloimmunthrombozytopenie) beitragen könnten.

Ausgehend von der Hypothese, dass die stringente Bindungsspezifität des menschlichen FcRn-Rezeptors einer genetischen Variabilität unterliegen könnte, sequenzierte ich daher die gesamte kodierende Region sowie die Promotorregion des humanen FcRn-Gens, das für die α -Kette des FcRn-Rezeptors kodiert, und überprüfte sie auf interindividuelle, genetische Polymorphismen anhand einer Stichprobe von 11 unverwandten, gesunden, kaukasischen Individuen.

Ich fand dabei keine Polymorphismen mit direktem Einfluss auf die Aminosäuresequenz innerhalb der kodierenden Region der α -Kette des FcRn-Rezeptors, sondern lediglich einen stillen C/T-Polymorphismus in Position 3646 sowie weitere genetische Variabilitäten außerhalb der AS-kodierenden Region des FcRn-Gens:

Diese bestanden in einem VNTR (variable number tandem repeat)-Polymorphismus mit ein bis fünf Wiederholungen eines 37-Basenpaarmotivs (VNTR 1-5) in einer Region innerhalb der Promotorregion des FcRn-Gens, sowie aus 3 weiteren SNPs (single nucleotide polymorphisms), die jeweils gekoppelt mit bestimmten VNTR-Allelen vorlagen.

In einer Kohorte von 427 anonymisierten Blutspendern fand ich eine Häufigkeit (Genfrequenz) der einzelnen, nach Länge der Wiederholungsregion definierten Allele

VNTR1-5 von 0,1; 7,5; 92,0; 0,2 und 0,2%, in der Reihenfolge ansteigender Anzahl der 37bp–Wiederholungsmotive.

„Stille“ Polymorphismen innerhalb einer Genregion, die nicht zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz des Genproduktes führen sowie Intron-Polymorphismen, die auch in Verbindung miteinander („linked polymorphisms“) auftreten, können mit unterschiedlicher Genexpression einher gehen. So waren verschiedene FcRn-Allele, die durch stille Polymorphismen in Exon 3 und Polymorphismen in Intron 4 und 5 definiert wurden, beim Rind mit unterschiedlichen IgG-Serumkonzentrationen der Kälber (Laegreid et al. 2002) und unterschiedlicher IgG-Kolostrum-Konzentration (Zhang et al. 2009) verbunden (vgl. Kap. 1.2.1.8.1). Dies ist auch für andere Gene, beispielsweise das $\alpha_2\beta_1$ -Protein, bekannt, wo stille Polymorphismen mit unterschiedlicher Protein-Expression auf Thrombozyten zu einer unterschiedlichen Thrombozyten-Bindung an Kollagen, assoziiert sind (Kritzik et al. 1998).

Polymorphismen in der Promotorregion können ebenfalls die Transkriptionsaktivität beeinflussen:

So führte ein Basenaustausch in der Promotorregion des Integrin α_2 -Genes in vitro zu einer niedrigeren Gen-Expression (Jacquelin et al. 2001), wobei der Basenaustausch mit stillen Polymorphismen in demselben Gen assoziiert war („linkage disequilibrium“; Kritzik et al. 1998). In vitro- Promotorstudien anderer Rezeptorsysteme, wie z.B. des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins ergaben, dass strukturelle Veränderungen im Sinne von spezifischen Mutationen in regulativen Regionen der 5'-flankierenden (Promotor-) Genregion die Transkription des Gens beeinflussen, woraus klinische Konsequenzen für die Alzheimer-Demenz abgeleitet wurden (Lahiri et al. 2000). Basenaustausche in der Promotorregion des Interleukin 10-Promotors waren mit Immunerkrankungen assoziiert und führten in vitro zu unterschiedlicher Genexpression (Steinke et al. 2004); ein Basenaustausch innerhalb des Promotors des endothelialen Nitrit-Gens (eNOS) führte in vitro zu unterschiedlicher Gen-Expression und unterschiedlichen NO-Konzentrationen in vivo (Hassan et al. 2004). Ein Basenaustausch in der Promotorregion des Integrin α_2 -Genes führte in vitro zu einer niedrigeren Gen-Expression (Jacquelin et al. 2001), wobei dieser Basenaustausch ebenfalls mit stillen Polymorphismen in demselben Gen assoziiert war.

Die biologischen Mechanismen hinter diesen Polymorphismen sind bisher noch wenig erforscht, eine bestimmte Länge der regulatorischen Region scheint jedoch ebenfalls wichtig für die optimale Gen-Transkription zu sein (Sabol et al. 1998).

Satelliten-DNA ist ein Oberbegriff für sich wiederholende Basensequenzen im menschlichen Genom. Handelt es sich bei der Satelliten-DNA um mehr als 10 Basenpaare, die wiederholt werden, spricht man von „Minisatelliten“ oder „Tandem-Repeats“. Handelt es sich um weniger als 10 Basenpaare, spricht man von „Mikrosatelliten“ oder „short tandem repeats“ (STR); letztere eignen sich, da sie in großer Zahl im menschlichen Genom mit jeweils multiplen Allelen vorhanden sind, u.a. zur Ahnen- und Populationsforschung sowie für forensische Belange (O’Brien et al. 1999). Solche „einfache, repetitive DNA“ („simple repetitive DNA“, bestehend aus 1-6 Basen, die 5 bis 100-fach oder öfter wiederholt werden kann), kann jedoch auch Erkrankungsrisiken erhöhen, sofern sie in der Nähe von menschlichen Genen auftritt (Epplen et al. 1997, Rutherford et al. 1997).

In unserem Fall vermuteten wir, dass der gefundene VNTR (variable number tandem repeat)-Polymorphismus in der Promotorregion des humanen FcRn-Gens, der außerdem mit 4 weiteren Polymorphismen innerhalb und außerhalb der kodierenden Gen-Region assoziiert ist, einen Einfluss auf die Expression des FcRn-Gens hat. So könnten die VNTR-Genotypen zu individuellen Unterschieden beim IgG-Transport führen, mit eventuellen klinischen Konsequenzen, beispielsweise bei der NAIT, vergleichbar oben genannter phänotypischer Auswirkungen von genetischen FcRn-Haplotypen auf die IgG-Konzentration bei Rindern (Laegreid et al. 2002, s.o.). Auf diese Weise könnte eine geringere FcRn-Expression zu einem geringeren maternofetalen IgG-Transport führen, was bei der FNAIT, wo IgG ein pathogenes Agens darstellt, für den Embryo von Vorteil wäre.

Auch für einen Einfluß von Mikrosatelliten-DNA auf die Gen-Expression gibt es bereits vielfältige Studien, hierzu einige Beispiele:

So waren Mikrosatelliten-Polymorphismen innerhalb der Promotorregion des Hämoxygenase-1-Genes mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Lungenemphysem bei Rauchern assoziiert (Yamada et al. 2000). Ein Mikrosatelliten-Polymorphismus in der Intron 1-Region des Gamma-Interferon-Gens war bei Schafen mit erhöhter Resistenz gegen gastrointestinale Nematoden verbunden (Coltman et al. 2000). Ein Tandem-Repeat-Polymorphismus von 17-Basenpaaren, mit 9 bis 12-fachen Wiederholungen, innerhalb des Serotonin-Transporter-Gen-Introns 2, zeigte im Tierversuch Allel-spezifische Expressionsverstärkung (MacKenzie et al. 1999), der allerdings nicht mit einer erhöhten Serotonin-Aufnahme in Blutplättchen assoziiert war (Kaiser et al. 2002). In der Promotor-Region des humanen RHOB-Gens, das für die Kontrolle des Zellwachstums, der Zytoskelett-Organisation, der Apoptose sowie neoplastische Transformation von Bedeutung ist, fanden sich bis zu 9 tandem-repeats

von 34-bp-Länge, wobei einige Allele *in vitro* die Promotor-Aktivität reduzierten (Tovar et al. 2003).

Um unsere Hypothese differenzieller FcRn-Transkription aufgrund der beschriebenen genetischen Unterschiede zu überprüfen, wurden sowohl Versuche auf Transkriptions- als auch auf Expressionsebene durchgeführt:

Für die Messung der FcRn-Transkription *in vivo* wurden Monozyten als Zell-Modellsystem ausgewählt, da diese FcRn exprimieren (Zhu et al. 2001) und zudem leicht zugänglich sind. Ich extrahierte RNA aus isolierten Monozyten unterschiedlich FcRn-genotypisierter Blutspender, transkribierte sie in cDNA und bestimmte die cDNA-Transkript-Menge per Real-Time-PCR am „light-cycler“.

Die Real-time-Quantifizierung der FcRn-RNA-Transkripte in Monozyten ergab, dass Monozyten VNTR2/3-heterozygoter Individuen signifikant weniger FcRn transkribieren als die Monozyten VNTR3/3-homozygoter Individuen.

Frühere *in vitro*-Studien anderer an Zelllinien hatten bereits ergeben, dass eine verstärkte FcRn mRNA-Expression mit einem erhöhtem IgG-Transport einhergeht (de Haas 2001).

Um diese Ergebnisse auf der FcRn-Expressionsebene zu überprüfen, wählten wir, da ein spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen FcRn nicht verfügbar war, eine indirekte, funktionelle Methode, die die bekannte Eigenschaft des FcRn-Rezeptors, bei saurem pH an IgG-Antikörper zu binden und die schon bei der Isolation des Rezeptors Anwendung gefunden hatte (Rodewald & Kraehenbuhl 1984, Simister & Mostov 1989): Isolierte Monozyten von Blutspendern unterschiedlichen FcRn-VNTR-Genotyps wurden auf ihre Bindungsaffinität zu immobilisierten, humanen IgG-Antikörpern untersucht.

Dabei ergab sich, dass auch die monozytäre IgG-Bindungskapazität von VNTR2/3-heterozygoten Spendern bei saurem pH-Wert signifikant geringer war, als die des VNTR3/3-Genotyps. Die zwei häufigsten FcRn-VNTR-Polymorphismen innerhalb der kaukasischen Bevölkerung scheinen also auch die monozytäre Expression der FcRn- α -Kette zu beeinflussen und so zu unterschiedlicher IgG-Bindungskapazität auf deren Zelloberfläche zu führen.

Um diese Ergebnisse *in vitro* zu überprüfen, wurde ein vektorielles Renilla-Luciferase-Reportergen-Zellsystem etabliert; als Vektor fungierte ein Plasmid-Konstrukt mit FcRn-VNTR-allelspezifischen Inserts der putativen FcRn-Promotorregion.

Hierbei zeigte sich, dass VNTR3 und VNTR2 auch das Reportergen in vitro signifikant unterschiedlich transkribieren: Das größere und häufigere VNTR3-Allel transkribierte das Reportergen effizienter als VNTR2, was unsere in Befunde an Monozyten bestätigte.

Zusammenfassend hat unsere Studie ergeben, dass ein VNTR-Polymorphismus in der Promotorregion des humanen FcRn-Rezeptors Auswirkungen auf die monozytäre FcRn-Transkription und -Expression bei Monozyten hat (Sachs et al. 2006).

Obwohl es möglich ist, dass die beschriebenen Promotor-variabilitäten die Expression von FcRn nicht nur in Monozyten, sondern auch in anderen Zellarten beeinflussen, gibt es dazu bisher keine weiteren Erkenntnisse.

Sollten unsere Ergebnisse auch für die Plazenta gelten, würde das bedeuten, dass Feten des VNTR2/3-Genotyps FcRn geringer auf der Zelloberfläche plazentarer, IgG-transportierender Zellen exprimieren würden, als VNTR3/3-Genotypen, wodurch im Fall mütterlicher Alloimmunisierung weniger IgG in den fetalen Kreislauf transportiert würde. Dies stünde im Einklang mit Beobachtungen beim MHN (morbus haemolyticus neonatorum), bei denen Mütter mit hoch-titrigen Anti-D-Antikörpern auch gesunde Kinder zur Welt bringen konnten (Dooren et al. 1993).

Sollte der FcRn-VNTR-3/2-Genotyp bei der FNAIT einen geringeren Schweregrad zur Folge haben, wäre damit auch ein genetischer Prädiktor für das Erkrankungsrisiko an der FNAIT verfügbar.

Unsere Hypothese von der Übertragbarkeit auf die Plazenta wird allerdings durch die Möglichkeit eingeschränkt, dass FcRn in unterschiedlichen Gewebearten unterschiedlich reguliert werden könnte.

Zur Überprüfung unserer Hypothese wurde unabhängig von der vorliegenden Arbeit bereits eine klinische Studie an einem Kollektiv von 104 Feten HPA-1a-negativer Müttern durchgeführt, die von einer HPA-1a-induzierten FNAIT betroffen waren: Diese konnte die Vermutung, dass Feten des VNTR2/3-Genotyps einen geringeren FNAIT-Schweregrad durch geringeren IgG-Transport erleiden würden als VNTR3/3 genotypisierte Feten, zunächst nicht bestätigen: Erstens fand sich kein Unterschied in der Verteilung der FcRn-VNTR-Genotypen im Vergleich zur Normalbevölkerung. Zweitens konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem FcRn-Genotyps und der fetalen Thrombozytenzahl nachgewiesen werden, es bestand jedoch eine Tendenz zu geringeren minimalen fetalen bzw. neonatalen Plättchenzahlen der VNTR3/3 genotypisierten Feten (Socher 2007).

Die Wahrscheinlichkeit genetischer Einflußfaktoren beim maternofetalen Transport pathogener Antikörper wird zudem durch jüngere FNAIT-Studien relativiert, die wieder einen engeren Zusammenhang zwischen maternaler, pathogener Antikörperkonzentration und Erkrankungsrisiko der FNAIT nahe legen (Skogen et al. 2009, Bertrand et al. 2011).

Die Bedeutung von FcRn geht jedoch weit über seine plazentare Transportfunktion hinaus: So spielt der Rezeptor außerdem eine zentrale Rolle im IgG-Metabolismus und -Homöostase (Roopenian et al. 2003, Ward et al. 2003, Baker et al. 2009, vgl. Kap. 1.2.1.8). Daher wären auch Auswirkungen auf den Verlauf und die Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise bei der Autoimmunthrombozytopenie (Hansen & Balthasar 2002), dem bullösen Pemphigoid (Liu et al. 1997), der Lupus-Nephritis (Zhou et al. 2009) sowie bei der Autoimmun-Anämie, M. Basedow, Myasthenia gravis etc. (Getman & Balthasar 2005), bei denen IgG ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, möglich (vgl. Kap. 1.2.4.1). Eine Studie, die chinesische Lupus-Nephritis-Patienten auf den FcRn-VNTR-Polymorphismus hin untersuchte, konnte allerdings keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen klinischem Verlauf und VNTR-Genotyp nachgewiesen; zudem zeigte sich, dass sich die Allel-Verteilung des FcRn-VNTR-Polymorphismus statistisch signifikant von der kaukasischer Patienten unterschied (Zhou et al. 2009).

Eine differenzielle Expression des humanen FcRn-Rezeptors könnte auch in anderen medizinischen Zusammenhängen, wenn IgG beispielsweise in Form therapeutischer Antikörper genutzt wird (Lobo et al. 2004), von Bedeutung sein (vgl. Kap. 1.2.4.2).

Es werden jedoch weitere klinische Studien nötig sein, um die Frage zu klären, ob VNTR-bedingte, differentielle FcRn-Expression den Verlauf von IgG-assoziierten Krankheiten, IgG-gebundene Therapien oder diagnostische Verfahren beeinflusst.

5 Zusammenfassung

Ich untersuchte das Gen des humanen FcRn Rezeptors auf genetische Variabilitäten. Beim Vergleich der DNA-Sequenzen 11 miteinander unverwandter Individuen fand ich eine stille Mutation in AS 171 in Exon 4 (bezogen auf die Genstruktur nach Mikulska 2000; resp. Exon 2 in AF220542). Ich untersuchte daraufhin die Häufigkeit der gefundenen Mutation in einem grösseren Kollektiv von 100 anonymisierten Blutspendern anhand eines Enzymfragment-Längenpolymorphismus und fand eine Genfrequenz von 7% für heterozygote Individuen der untersuchten Mutation.

Daraufhin untersuchte ich die Promotor-Region des FcRn-Gens auf weitere genetische Variabilitäten. Hierbei fand ich einen VNTR-Polymorphismus, der aus einer 1-5-fachen Wiederholung eines 37-Basenpaar-Motivs bestand, sowie weiteren Mutationen, die in Verbindung („linkage-disequilibrium“) miteinander sowie mit dem AS 171-Basenaustausch vorlagen.

Isolierte Monozyten unterschiedlich FcRn-VNTR-genotypisierter Blutspender zeigten eine quantitativ unterschiedliche FcRn-Transkription. Renilla-Luciferase-Reportergen-Plasmid-Assays der beiden häufigsten VNTR-Allele VNTR 3 (92 %) und VNTR 2 (7,5 %) zeigten eine entsprechend quantitativ-differenzielle Expressionsaktivität in vitro. Monozyten unterschiedlich FcRn-VNTR-typisierter Blutspender zeigten zudem entsprechend differenzielle IgG-Bindungskapazitäten bei saurem pH, was auf eine unterschiedliche FcRn-Expression schliessen lässt.

Diese Ergebnisse zeigen eine VNTR-spezifische Regulation des FcRn-Gens an humanen Monozyten. Sollte FcRn an der Plazenta vergleichbar reguliert werden, könnte dies Auswirkungen auf das Risiko und die Ausprägung einer Alloimmunthrombozytopenie bei Neugeborenen haben. Auch andere Allo- und Autoimmunerkrankungen, bei denen FcRn eine Bedeutung zugeschrieben wird, könnten durch unterschiedliche FcRn-Genotypen unterschiedliche Verlaufsformen annehmen.

6 Summary

I examined the gene of the human FcRn-receptor for genetic variabilities. Comparing the DNA-sequences of 11 unrelated individuals I found a silent mutation in AS 107 in exon 4 (referred to the gene-structure of Mikulska 2000; resp. exon 2 in AF220542). Then I examined the frequency of the mutation in a larger cohort of 100 anonymized blood-donors and it found to be 7% for heterozygous individuals.

After that I examined the promotor-region of the human FcRn-gene for genetic variabilities. I found a VNTR-polymorphism, consisting of a 1-5 fold repetition of a 37 basepare-motiv and other SNPs in dislinkage-equilibrium with each other and with the AS 107 polymorphism.

Isolated monocytes of differently FcRn-genotyped blood donors showed quantitative different FcRn-RNA-levels. Renilla-luciferase reportergene-plasmid-assays of the most frequent VNTR-genotypes, VNTR 3 (92 %) and VNTR 2 (7,5 %) showed analogous different gene-expeession-activity in vitro. Monocytes of different FcRn-VNTR-genotyped blood-donors showed appropriate different IgG-bindig-affinity at lower pH-conditions, suggesting analogous VNTR-specific FcRn-translation in monocytes.

These results suggest differential, VNTR-specific regulation of the human FcRn-gene in monocytes. If FcRn was similar regulated in the placenta, this could have impact on risico and severity of alloimmunethrombocytopenia in neonates. Other allo- and autoimmune disorders, where FcRn is also suggested to be important, could show FcRn-VNTR-specific different courses too.

7 Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
Abb:	Abbildung
APC:	Antigenpräsentierende Zellen
AS:	Aminosäure
ATG:	Start-Kodon für die Translation
ATP:	Adenosintriphosphat
b:	Base
bp:	Basenpaare
BC	buffy-coat
C:	Cytosin
cDNA:	komplementäre DNA
CH(1/2):	konstantes, schweres Fragment des Fc-Antikörpers
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphaten
E:	Exon(e)
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EDV:	elektronische Datenverarbeitung
et al:	und weitere (Autoren)
Fc:	kristallines Fragment des IgG-Antikörpers
FCGRT:	Fc-Gen-Transportrezeptor (Bezeichnung des Gens für den FcRn-Rezeptor)
G:	Guanin
hFcRn:	humane Form des FcRn
FcRB:	„Brambell“-Fc-Rezeptor
FcRn:	Neonataler Fc- (Antikörper-) Rezeptor
FNAIT:	Fetale und Neonatale Alloimmunthrombozytopenie

HEPG2:	hepatogenen Zelllinien
IgG:	Immunglobulin G
IVIgG:	intravenös verabreichte, hochdosierte Immunglobuline der Klasse IgG
Kap:	Kapitel
kb:	kilobasen
kDa:	kilo Dalton (Atomare Masseneinheit)
MDCK:	Madin Darby canine kidney
MHC:	major histocompatibility complex
MHN:	Morbus haemolyticus neonatorum
mRNA:	messenger-RNA
P:	PCR-Amplifikationsprodukt
PBS:	Phosphate buffer saline
PCR:	Polymerase chain reaction
pH:	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
RLE	relative Lichteinheiten
RHOB:	Ras homolog gene family, member B
RNA:	Ribonukleinsäure
S:	Seite
s.o:	siehe oben
STR:	short tandem repeat
SNP:	single nucleotide polymorphism
T:	Thymin
Tab:	Tabelle
TBE:	Tris-Borat EDTA Puffer
UV:	ultraviolett
vgl:	vergleiche
VNTR:	variable number tandem repeats

8 Darstellungs-, Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1: IgG-Aufnahme, -Recycling u. -Transport (nach Ghetie & Ward 2000), S. 4

Abb. 2: Struktur-Modell für FcRn als MHC-Klasse I-Molekül (Raghavan et al. 1994), S. 6

Abb. 3: 2:1-Heterotrimer, bestehend aus 2 FcRn-Molekülen der Ratte in „lying-down“-Anordnung und einem Fc-IgG-Molekül (Burmeister, Huber et al. 1994), S.7

Abb. 4: genomische Struktur des FcRn-Gens nach Mikulska et al., modifiziert, S. 9

Abb. 5: Querschnitt einer Chorionzotte im 3. Trimenon der Schwangerschaft (nach Kristoffersen, 1996), S. 18

Abb. 6: Plazentare IgG-Rezeptoren, die für den IgG-Transport in Frage kamen (nach Simister & Story 1997), S. 19

Abb. 7: Amplifikationsstrategie des FcRn-Gens, Gen-Darstellung in Anlehnung an Mikulska, S. 26

Abb. 8: SNP in Aminosäure 171, Exon 4, hier in 3' - 5' - (rückwärts-) Richtung, S. 38

Abb 9: Darstellung der genomischen Struktur des FcRn-Gens nach Mikulska (Mikulska et al. 2000), S. 39

Abb. 10: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus in AS 171, S. 39

Abb. 11: Wiederholungsregion (Minisatellit, „VNTR“) und Polymorphismen in der FcRn-Promotorregion, Gen-Darstellung nach Mikulska (Mikulska 2000), S. 40

Abb. 12: „repeats“-PCR zur Darstellung der einzelnen Allele des VNTR-Polymorphismus in der Promotorregion des FcRn-Gens, S. 41

Abb. 13: Luminometrische Darstellung der Promotor-Aktivität anhand der Expression eines Luciferas-Reportergens unterschiedlicher FcRn-VNTR-Genotypen, S. 46

Abb. 14: Affinität von Monozyten unterschiedlicher FcRn-VNTR-Allele an IgG (A) und PBS (negativ-Kontrolle, B) bei pH 6,5 (links) und 6,0 (rechts), S. 47 / 48

Tabellen:

- Tab. 1: speziesspezifische, aktiver „Erwerb“ passiver Immunität (nach Junghans, 1997), S. 15
- Tab. 2: speziesspezifische Weitergabe von IgG-Antikörpern auf die nächste Generation [Kristoffersen 1996 (nach Brambell 1970)], S. 17 / 18
- Tab. 3: PCR-Produkte zur Sequenzierung des FcRn-Gens, S. 26 / 27
- Tab. 4: Bei der Amplifikation verwendete Primer, Basen-Zählung bezogen auf AF220542, S. 27
- Tab. 5: PCR-Bedingungen der einzelnen PCR-Produkte (vgl. Tab. 3 u. 4), S. 28
- Tab. 6: in der Quantifizierungsreaktion der real-time-PCR verwendete Primer, S. 33
- Tab. 7: Wiederholungssequenz („repeat“), S. 42
- Tab. 8: Aufbau der einzelnen VNTR-Allele durch die Wiederholungssequenztypen, S. 42
- Tab. 9: errechnete Genfrequenzen (Häufigkeit) der definierten VNTR-Allele des FcRn-Gens, S. 43
- Tab. 10: Vergleich unserer Sequenzierungen mit AF220542, S. 44
- Tab. 11: errechneter Gehalt an FcRn-m-RNA 10 FcRn-typisierter Monozytenspenden, S. 45

9 Literaturverzeichnis / Quellenangaben

Aalberse RC, Schuurman J: IgG4 breaking the rules, *Immunology* 2002; 105: 9-19

Ahouse JJ, Hagermann CL, Mittal P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Simister NE: Mouse MHC Class I-like Fc Receptor Encoded Outside the MHC; *The Journal of Immunology* 1993; 151: 6076-6088

Akilesh S, Petkova S, Sproule TJ, Shaffer DJ, Christianson GJ, Roopenian D: The MHC class I-like Fc receptor promotes humorally mediated autoimmune disease, *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 113: 1328-1333

Akilesh S, Huber TB, WU H et al.: Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 967-972

Baker K, Qiao S-W, Kuo T, Kobayashi K, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS: Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn, *Seminars In Immunopathology* 2009; 31: 223-236

Batty I, Brambell FWR, Hemmings WA, Oakley CL: Selection of antitoxins by the foetal membranes of rabbits, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 1954; 142: 452-471

Berkowitz RL, Kolb EA, McFarland JG, Wissert M, Primani A, Lesser M, Bussel JB: Parallel Randomized Trials of Risk-Based Therapy for Fetal Alloimmune Thrombocytopenia, *Obstetrics & Gynecology* 2006; 107: 91-96

Bertrand G, Drame M, Martageix C, Kaplan C: Prediction of the fetal status in noninvasive management of alloimmune thrombocytopenia, *Blood* 2011; 117: 3209-3213

Blumberg RS, Story CM, Barisani D, Polischuk J, Lipin A, Pablo L, Green R, Simister NE: A Major Histocompatibility Complex Class I-related Fc Receptor for IgG on Rat Hepatocytes, *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95: 2397-2402

Borvak J, Richardson J, Medesan C, Antohe F, Radu C, Simionescu M, Ghetie V, Ward ES: Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice, *International Immunology* 1998; 10: 1289-1298

Brambell FWR, Hemmings WA, Henderson M, Rowlands WT: The selective admission of antibodies to the foetus by the yolk-sac splanchnopleur in rabbits, *Proc Roy Soc. B* 1950, 137: 239-252

Brambell FWR, Hemmings GP, Hemmings WA, Henderson M, Rowlands WT: The route by which antibodies enter the circulation after injection of immune serum into the exocoel of foetal rabbits, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, biological sciences* 1951; 138: 188-195

Brambell FRS, Hemmings WA, Hendersson M, Oakley CL, Rowlands WT: The accumulation of antibodies in the stomach contents of foetal rabbits, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, biological sciences* 1951; 138: 195-204

Brambell FWR, Hemmings WA, Henderson M, Kekwick RA: Electrophoretic studies of serum proteins of foetal rabbits, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character* 1953; 141: 300-314

Brambell FWR, Halliday R, Brierley J, Hemmings WA: Transference of passive immunity from mother to young, *The Lancet* 1954; 266: 964-965

Brambell FWR, Halliday R: The route by which passive immunity is transmitted from mother to foetus in the rat, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character* 1956; 145: 170-178

Brambell FWR, Halliday R, Morris IG: Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice, Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character 1958; 149: 1-11

Brambell FWR, Hemmings WA, Oakley CL, Porter RR: The relative transmission of natural and pepsin-refined homologous antitoxin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit, Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character 1959; 150: 312-317

Brambell FWR, Hemmings WA, Oakley CL, Porter FRS and RR: The relative transmission of the fractions of papain hydrolysed homologous γ -globulin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit, Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character 1960; 151: 478-482

Brambell, FWR: Protein Transfer across the foetal membranes, British medical Bulletin 1961; 17: 96-101

Brambell FWR: The Transmission of Antibodies from Mother to Young; Problems Concerning the Transmission of Immunity from Mother to Young Proceedings of the Royal Society of Medicine 1961; 54: 992-993

Brambell FWR: Resemblances between passive anaphylactic sensitization and transmission of passive immunity, Nature 1963; 199: 1164-1166.

Brambell FWR, Hemmings WA, Morris IG: A theoretical model of γ -Globulin catabolism, Nature 1964; 203:1352-1354

Brambell FWR: The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins, Lancet 1966; 2: 1087-1093

Brambell FWR: The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young, *Proceedings of the Nutrition Society* 1969; 28: 35-41

Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ: Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor, *Nature* 1994; 372: 336-343

Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ: Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc, *Nature* 1994; 372: 336-343

Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL: The Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan, *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197: 315-322

Chen P, Li C, Lang S, Zhu G, Reheman A, Spring CM, Freedman J, Ni H: Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy, *Blood* 2010; 116: 3660-3668

Chevalier D, Cauffiez C, Bernard C et al. Characterization of new mutations in the coding sequence and 5'-untranslated region of the human prostacyclin synthase gene (CYP9A1) *Hum Genet* 2001; 108: 148-155

Cianga P, Medesan C, Richardson JA, Ghetie V, Ward ES: Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice, *European Journal of Immunology* 1999; 29: 2515-2523

Cianga P, Cianga C, Cozma L, Ward ES, Carasevici E: The MHC Class I Related Fc Receptor, FcRn, is Expressed in the Epithelial Cells of the Human Mammary Gland, *Human Immunology* 2003; 64: 1152-1159

Claypool SM, Dickinson BL, Wagner JS, Johannsen F-E, Venu N, Borawski JA, Lencer WI, Blumberg RS: Bidirectional Transepithelial IgG Transport by a Strongly Polarized

Basolateral Membrane Fcγ-Receptor, *Molecular Biology of the Cell* 2004; 15: 1746-1759

Coltman DW, Wilson K, Pilkington JG, Stear MJ, Pemberton JM: A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep, *Parasitology* 2001; 122: 571-582

Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, Wu H, Kiener PA, Langermann S: Increasing the Affinity of a Human IgG1 for the Neonatal Fc Receptor: Biological Consequences, *The Journal of Immunology* 2002; 169: 5171-5180

van Dijk BA, Dooren MC, Overbeeke MAM: Red cell antibodies in pregnancy: there is no "critical titre", *Transfusion Medicine* 1995; 4: 199-202

Dooren MC, Engelfriet CP: Protection Against Rh D-Haemolytic Disease of the Newborn by a Diminished Transport of Maternal IgG to the Fetus, *Vox Sang* 1993; 65: 59-61

Doughty RW, Gelsthorpe K: Some Parameters of Lymphocyte Antibody Activity through Pregnancy and Further Eluates of Placental Material, *Tissue Antigens* 1976; 8: 43-48

Ehrlich P: Über Immunität durch Vererbung und Säugung; *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 1892; 12: 183-203

Ellinger I, Schwab M, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R: IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta, *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 733-744

Ellinger I, Reischer H, Lehner C, Leitner K, Hunziker W, Fuchs R: Overexpression of the Human Neonatal Fc-receptor α -chain in Trophoblast-derived BeWo Cells Increases Cellular Retention of β 2-microglobulin, *Placenta* 2005; 26: 171-182

Epplen C, Santos EJM, Mäueler W, van Helden P, Epplen JT: On simple repetitive DNA sequences and complex diseases, *Electrophoresis* 1997; 18: 1577-1585

Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D, Antohe F, Ghetie V, Ward ES: The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of γ -globulin in humans, *International Immunology* 2001; 13: 993-1002

Gafencu A, Heltianu C, Burlacu A, Hunziker W, Simionescu M: Investigation of IgG Receptors Expressed on the Surface of Human Placental Endothelial Cells, *Placenta* 2003; 24: 664-676

Garner SF, Gorick BD, Lai WYY, Brown D, Taverner J, Hughes-Jones NC, Contreras M, Lubenko A: Prediction of the Severity of Hemolytic Disease of the Newborn; *Vox Sanguinis* 1995; 68: 169-176

Gastinel LN, Simister NE, Bjorkman PJ: Expression and crystallization of a soluble and functional form of an Fc receptor related to class I histocompatibility molecules, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 89: 638-642.

Getman KE, Balthasar JP: Pharmacokinetic Effects of 4C9, an Anti-FcRn Antibody, in Rats: Implications for the use of FcRn Inhibitors for the Treatment of Humoral Autoimmune and Alloimmune Conditions, *Journal of pharmaceutical science* 2005; 94: 718–729

Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen M-F, Lee Y, Ward ES: Abnormally short serum half-lives of IgG in β 2-microglobulin-deficient mice, *European Journal of Immunology* 1996; 26: 690-696

Ghetie V, Ward ES: FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter, *Immunology today* 1997; 18: 592-598

Ghetie V, Ward ES: Multiple roles for the Major Histocompatibility complex class I-related receptor FcRn, *Annual Review of Immunology* 2000; 18: 739-766

Guyer, LR, Koshland ME, Knopf PM: Immunoglobulin binding by mouse intestinal epithelial cell receptors, *The Journal of Immunology* 1976; 117: 587-593

de Haas M: IgG-Fc receptors and the clinical relevance of their polymorphisms, *Wiener klinische Wochenschrift* 2001; 113: 825-831

Hadley AG: Correlation of serological, quantitative and cell-mediated functional assays of maternal alloantibodies with the severity of haemolytic disease of the newborn; *British Journal of Haematology* 1991; 77: 221-228

Hadley AG: A Comparison of in Vitro Tests for predicting the Severity of Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn, *Vox Sanguinis* 1998; 74: 375-383

Hansen RJ, Balthasar JP: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of the Effects of Intravenous Immunoglobulin on the Disposition of Antiplatelet Antibodies in a Rat Model of Immune Thrombocytopenia, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 92: 1625-1637

Hassan A, Gormley K, O'Sullivan M, Knight J, Sham P, Vallance P, Bamford J, Markus H: Endothelial Nitric Oxide Gene Haplotypes and Risk of Cerebral Small-Vessel Disease, *Stroke* 2004; 35: 645-659

Haymann JP, Levraud JP, Bouet S, Kappes V, Hagège J, Nguyen G, Xu Y, Rondeau E, Sraer J-D: Characterization and Localization of the Neonatal Fc Receptor in Adult Human Kidney, *Journal of the American Society of Nephrology* 2000; 11: 632-639

Hemmings W.A. & Brambell F.W. R.: Protein transfer across foetal membranes; *British medical Bulletin* 1961; 17: 96-101

Hinton PR, Johlfs MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, Bullock C, Keller S, Tang MT, Tso JY, Vásquez M, Tsurushita N: Engineered Human IgG Antibodies with Longer Serum Half-lives in Primates, *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 6213-6216

Huber AH, Kelley RF, Gastinel LN, Bjorkman PJ: Crystallization and Stoichiometry of Binding of a Complex between a Rat Intestinal Fc Receptor and Fc, *Journal of Molecular Biology* 1993; 230: 1077-1083

Israel, EJ, Patel VK, Taylor SF, Marshak-Rothstein, A, Simister NE: Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice, *Journal of Immunology* 1995; 154: 6246-6251

Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, Simister NE: Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells, *Immunology* 1997; 92: 69-74

Jacquelin B, Tarantino MD, Kritzik M, Rozenshteyn D, Koziol JA, Nurden AT, Kunicki TJ: Allele-dependent transcriptional regulation of the human integrin $\alpha 2$ gene, *Blood* 2001; 97: 1721-1726

Jeannet M, Werner C, Ramirez E, Vassalli P, Faulk WP: Anti-HLA, Anti-Human "Ia-Like" and MLC Blocking Activity of Human Placental IgG, *Transplantation Proceedings* 1977; 9: 1417-1422

Jiang L, Wang J, Solorzano-Vargas RS, Tsai HV, Gutierrez EM, Ontiveros LO, Kiela PR, Wu SV, Marín MG: Characterization of the rat intestinal Fc receptor (FcRn) promoter: transcriptional regulation of FcRn gene by the Sp family of transcription factors, *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004; 286: G922-G931

Jones EA, Waldmann TA: The Mechanism of Intestinal Uptake and Transcellular Transport of IgG in the Neonatal Rat, *The Journal of Clinical Investigation* 1972; 51: 2916-2927

Junghans RP, Anderson CL: The protection receptor for IgG catabolism is the β_2 -microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 5512-5516

Junghans, RP: Finally! The Brambell Receptor (FcRB), *Immunologic Research* 1997; 16: 29-57

Kacskovics I: Fc receptors in livestock species, *Veterinary immunology and immunopathology* 2004; 102: 351-362

Kaiser R, Müller-Oerlinghausen B, Filler D, Tremblay P-B, Berghöfer A, Roots I, Brockmöller J: Correlation Between Serotonin Uptake in Human Blood Platelets With the 44-bp Polymorphism and the 17-bp Variable Number of Tandem Repeat of the Serotonin Transporter, *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 2002; 114: 323-238

Kandil E, Munechika N, Ishibashi T, Kasahara M: Structural and Phylogenetic Analysis of the MHC Class I-Like Fc Receptor Gene, *The Journal of Immunology*, 1995; 154: 5907-5918

Kandil, E, Egashira, M., Miyosi, O., Niikawa, N., Ishibashi, T. and Kasahara, M: The human gene encoding the heavy chain of the major histocompatibility complex class I-

like Fc receptor (FCGRT) maps to 19q13.3, Cytogenetics and Cell Genetics 1996; 73: 97-98

Kenanova V, Olafsen T, Crow DM, Sundaresan G, Subbarayan M, Carter NH, Ikle DN, Yazaki PJ, Chatziioannou AF, Gambhieri SS, Williams LE, Shiverly JE, Colcher, Raubitschek AA, Wu AM: Tailoring the Pharmacokinetics and Positron Emission Tomography Imaging Properties of Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments, Cancer Research 2005; 65: 622-631

Kiefel V., Kroll H. u Mueller Eckhardt: Neonatale Alloimmunthrombozytopenie, Deutsche medizinische Wochenschrift 1994; 119: 1512-1517

Kim JK, Tsen M-F, Ghetie V & Ward ES: Catabolism of the Murine IgG1 Molecule: Evidence that Both CH2-CH3 Domain Interfaces are Required for Persistence of IgG1 in the Circulation of Mice, Scandinavian Journal of Immunology 1994; 40: 457-465

Kim JK, Tsen M-F, Ghetie V & Ward ES: Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor, European Journal of Immunology 1994; 24: 2429-2434

Kim JK, Firan M, Radu CG, Kim C-H, Ghetie V, Ward ES: Mapping the site on human IgG binding of the MHC class I-related receptor, FcRn, European Journal of Immunology 1999; 29: 2819-2825

Kim J, Mohanty S, Ganesan LP, Hua K, Jarjoura D, Hayton WL, Robinson JM, Anderson CL: FcRn in the Yolk Sac Endoderm of Mouse Is Required for IgG Transport to Fetus, The Journal of Immunology 2009; 182: 2583-2589

Kristoffersen EK, Matre R: Co-localization of β 2-microglobulin and IgG in human placental syncytiotrophoblasts, European Journal of Immunology 1996; 26: 505-507

Kristoffersen EK: Human placental Fc γ -binding proteins in the maternofetal transfer of IgG, APMIS 1996; 104: 5-36

Kristoffersen EK: Placental Fc Receptors and the Transfer of Maternal IgG, Transfusion Medicine Reviews 2000; 14: 234-243

Kritzig M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ: Nucleotide Polymorphisms in the α_2 Gene Define Multiple Alleles That Are Associated With Differences in Platelet $\alpha_2\beta_1$ Density, Blood 1998; 92: 2382-2388

Kurz M, Stöckelle E, Eichelberger B, Panzer S: IgG titer, subclass, and light-chain phenotype of pregnancy-induced HPA-5b antibodies that cause or do not cause neonatal alloimmune thrombocytopenia; Immunohematology 1999; 39: 379-382

Laegreid WW, Haeton MP, Keen JE, Grosse WM, Chitko-McKown CG, Smith TPL, Keele JW, Bennett GL, Besser TE: Association of bovine neonatal Fc receptor α -chain gene (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves, Mammalian Genome 2002; 13: 704-710

Lahiri DK, Song W, Ge Y-W: Analysis of the 5'-flanking region of the β -amyloid precursor protein gene that contributes to increased promoter activity in differentiated neuronal cells, Molecular Brain Research 2000; 77: 185-198

Leach L, Eaton BM, Firth JA, Contractor SF: Uptake and intracellular routing of peroxidase-conjugated immunoglobulin-G by the perfused human placenta, Cell Tissue Research 1990; 261: 383-388

Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL: Isolation from Human Placenta of the IgG Transporter, FcRn, and Localization to the Syncytiotrophoblast, The Journal of Immunology 1996; 157: 3317-3322

Lencer WI, Blumberg RS: A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn, *TRENDS in Cell Biology* 2005; 15: 5-9

Liu Z, Roopenian DC, Zhou X, Christianson GJ, Diaz LA, Sedmak DD, Andersson CL: β_2 -microglobulin-deficient Mice Resistant to Bullous Pemphigoid, *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186: 777-783

Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Method, *Methods* 2001; 25: 402-408

Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP: Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Journal of pharmaceutical sciences* 2004; 93: 2645–2668

Low SC, Nunes SL, Bitonti AJ, Dumont JA: Oral and pulmonary delivery of FSH-Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis, *Human Reproduction* 2005; 20: 1805-1813

Lyden, TW, Robinson JM, Tridandapani S, Teillaud J-L, Garber SA, Osborne JM, Frey J, Budde P, Anderson CL: The Fc Receptor for IgG Expressed in the Villus Endothelium of Human Placenta Is Fc γ RIIb2, *The Journal of Immunology* 2001; 166: 3832-3889

MacKenzie A, Quinn J: A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorder, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 1999; 96: 15251-15255

Martin WL, Bjorkman PJ: Characterization of the 2:1 Complex between the Class I MHC-Related Fc Receptor and Its Fc Ligand in Solution, *Biochemistry* 1999; 38: 12639-12647

Martín MG, Wu SV, Walsch JH: Hormonal control of intestinal Fc receptor gene expression and immunoglobulins transport in suckling rats, *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 2844-2849

Matre, R., Kleppe, G. and Tonder, O., Isolation and characterization of Fcγ receptors from human placenta, *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section C* 1981; 89: 209-213

McCarthy KM, Yoong Y, Simister NE: Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia, *Journal of Cell Science* 2000; 113: 1277-1285

Medesan C, Radu C, Kim J-K, Ghetie V, Ward ES: Localization of the site of the IgG molecule that regulates maternofetal transmission in mice, *European Journal of Immunology* 1996; 26: 2533-2536

Medesan C, Matesoi D, Radu C, Ghetie V, Ward ES: Delineation of the Amino Acid Residues Involved in Transcytosis and Catabolism of Mouse IgG1, *The Journal of Immunology* 1997; 158: 2211-2217

Mi W, Wanjie S, Lo S-T, Gan Z, Pickl-Herk B, Ober RJ, Ward ES: Targeting the Neonatal Fc Receptor for Antigen Delivery Using Engineered Fc Fragments, *The Journal of Immunology* 2008; 181: 7550-7561

Mikulska JE, Pablo L, Canel J, Simister NE: Cloning and analysis of the gene encoding the human neonatal Fc receptor, *European Journal of Immunogenetics* 2000; 27: 231-240

Mikulska JE, Simister NE: Analysis of the promoter region of the human FcRn gene, *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1492: 80-184

Morgan CL, Cannell GR, Addison RS, Minchinton RM: The effect of intravenous immunoglobulin on placental transfer of a platelet-specific antibody: Anti-P1^{A1}, *Transfusion Medicine* 1991; 1: 209-216

Mueller-Eckardt C, Kiefel V, Grubert A, Kroll H, Weisheit M, Schmidt S, Mueller-Eckhardt G, Santoso S: 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia; *Lancet* 1989; 1: 363-366

Murphy MF, Bussel JB: Advances in the management of alloimmune thrombocytopenia, *British Journal of Haematology* 2006; 136: 366-378

Murphy MF, Waters AH, Doughty HA, Hambley H, Mibashan RS: Antenatal management of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia-report of 15 affected pregnancies, *Transfusion Medicine* 1994; 4: 281-292

O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wieberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves, JA: The Promise of Comparative Genomics in Mammals, *Science* 1999; 286: 458-481

Ober RJ, Martinez C, Lai X, Zhou J, Ward ES: Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: An analysis at the single molecule level, *Proceedings of the National Academy of Science* 2004; 101: 11076-11081

Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward ES: Visualizing the Site and Dynamics of IgG Salvage by the MHC Class I-Related Receptor, FcRn, *The Journal of Immunology* 2004; 172: 2021-2029

Oganesyan V, Damschroeder MM, Woods RM, Cook KE, Wu H, Dall'Acqua WF: Structural characterization of a human Fc fragment engineered for extended serum half-life, *Molecular immunology* 2009; 46: 1750-1755

Ohto H, Yamaguchi T, Takeuchi C, Tohyama Y, Sato A, Morita S et al: Anti-HPA-5b-induced neonatal alloimmune thrombocytopenia: antibody titre as a predictor; British Journal of Haematology 2000; 110: 223-227

Popov S, Hubbard JG, Kim J-K, Ober B, Ghetie V, Ward ES: The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related Receptor, FcRn, Molecular Immunology 1996; 33: 521-530

Praetor A, Ellinger I, Hunziker W: Intracellular traffic of the MHC class I-like IgG Fc receptor, FcRn, expressed in epithelial MDCK cells, Journal of Cell Science 1999; 112: 2291-2299

Presta LG: Molecular engineering and design of therapeutic antibodies, Current Opinion in Immunology 2008; 20: 460-470

Proulx C, Filion M, Goldman M, Bradley A, Devine D, Décary F, Chartrand P: Analysis of immunoglobulin class, IgG subclass and titre of HPA-1a antibodies in alloimmunized mothers giving birth to babies with or without neonatal alloimmune thrombocytopenia, British Journal of Haematology 1994; 87: 813-817

Radulescu L, Antohe F, Jinga V, Ghetie V, Sinionescu M: Neonatal Fc Receptors Discriminates and Monitors the Pathway of Native and Modified Immunoglobulin G in Placental Endothelial Cells, Human Immunology 2004; 65: 578-585

Raghavan M, Gastinel LN, Bjorkman PJ: The Class I Major Histocompatibility Complex Related Fc Receptor Shows pH-Dependent Stability Differences Correlating with Immunoglobulin Binding and Release, Biochemistry 1993; 32: 8654-8660

Raghavan M, Chen MY, Gastinel LN, Bjorkman PJ: Investigation of the Interaction between the Class I MHC-Related Fc Receptor and its Immunoglobulin G Ligand, Immunity 1994; 1: 303-315

Raghavan M, Wang Y, Bjorkman PJ: Effects of receptor dimerization on the interaction between the class I major histocompatibility complex-related Fc-receptor and IgG, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 1995; 92: 11200-11204

Raghavan M, Bonagura VR, Morrison SL, Bjorkman PJ: Analysis of the pH Dependence of the Neonatal Fc Receptor/Immunoglobulin G Interaction Using Antibody and Receptor Variants, Biochemistry 1995; 34: 14649-14657

Raghavan M, Bjorkman PJ: Fc Receptors and their interaction with immunoglobulins, Annual Review of Cell and Developmental Biology 1996; 12: 181-220

Rayment R, Brunskill SJ, Soothill PW, Roberts DJ, Bussell JB, Murphy MF: Antenatal interventions for fetomaternal alloimmune thrombocytopenia (Review), The Cochrane Library 2011; 5: 1-49

Roberts DM, Guenther M, Rodewald R: Isolation and Characterization of the Fc Receptor from the Fetal Yolk Sac of the Rat, The Journal of Cell Biology 1990; 111: 1867-1876

Rodewald, R: Intestinal transport of antibodies in the newborn rat, The Journal of Cell Biology 1973; 58: 189-211

Rodewald R: pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat, The Journal of Cell Biology 1976; 71: 666-670

Rodewald R, Kraehenbuhl J-P: Receptor-mediated transport of IgG. J Cell Biology 1984; 99: 159s-164s

Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, Petkova S, Avanesian L, Choi EY, Shaffer DJ, Eden PA, Anderson CL: The MHC Class I-Like IgG

Receptor Controls Perinatal IgG Transport, IgG Homeostasis, and Fate of IgG-Fc-Coupled Drugs, *The Journal of Immunology* 2003; 170: 3528-3533

Roopenian DC, Akilesh S: FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 715-725

Rutherford S, Nyholt DR, Curtain RP, Quinlan SR, Gaffney PT, Morris BJ, Griffiths LR: Association of a low density lipoprotein receptor microsatellite variant with obesity, *International Journal of Obesity* 1997; 21: 1032-1037

Sabol SZ, Hu S, Hamer D: A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter, *Human Genetics* 1998; 103: 273-279

Sachs UJ, Bakchoul T, Kiefel V, Santoso S: To the editor: Prediction of fetal status in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT)? *Blood* 2011; 118: 2637-2638

Sachs UJ, Socher I, Braeunlich CG, Kroll H, Bein G, Santoso S: A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor α -chain promoter, *Immunology* 2006; 119: 83-89

Sainio S, Teramo K, Kekomäki R: Prenatal treatment of severe fetomaternal alloimmune thrombocytopenia, *Transfusion Medicine* 1999; 9: 321-330

Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M: Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface, *Reviews of Reproduction* 1999; 4: 81-89

Sánchez LM, Penny DM, Bjorkman PJ: Stoichiometry of the Interaction between the Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor and Its Ligand, *Biochemistry* 1999; 38: 9471-9476

Shah U, Dickinson BL, Blumberg R, Simister NE, Lencer WI, Walker A: Distribution of the IgG Fc Receptor, FcRn, in the Human Fetal Intestine, *Pediatric Research* 2003; 53: 295-301

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG: High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 für FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR, *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 6591-6604

Simister NE, Rees AR: Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine, *European Journal of Immunology* 1985; 15: 733-738

Simister NE, Mostov KE: An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens, *Nature* 1989; 337: 184-187

Simister NE, Story CM, Chen H-L, Hunt JS: An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta, *European Journal of Immunology* 1996; 26: 1527-1531

Simister NE, Creighton Ahouse J: The structure and evolution of FcRn, *Research in Immunology* 1996; 147: 333-337

Simister NE, Israel EJ, Ahouse JC, Story CM: New functions of the MHC class I-related Fc receptor, FcRn, *Biochemical Society Transactions, Immunoglobulins and Mechanisms of Mucosal Immunity* 1997; 25: 481-486

Simister NE, Story CM: Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus L (Review), *Journal of Reproductive Immunology* 1997; 37: 1-23

Simister, NE: Placental transport of immunoglobulin G (Review), *Vaccine* 2003; 21: 3365-3369

Skogen B, Husebekk A, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J: Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia is Not What It was, *Scandinavian Journal of Immunology* 2009; 70: 531-534

Socher, I: Transport- und Bindungsmechanismen von thrombozytären Alloantikörpern und deren Assoziation zur fetalen und neonatalen Blutungsneigung, *Inaugural-Dissertation an der Universität Gießen*, 2007: 77-80

Spiekermann GM, Finn PW, Ward ES, Dumont J, Dickinson BL, Blumberg RS, Lencer WI: Receptor-mediated Immunoglobulin G Transport Across Mucosal Barriers in Adult Life: Functional Expression of FcRn in the Mammalian Lung, *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196: 303-310

Stefaner I, Praetor A, Hunziker W: Nonvectorial Surface Transport, Endocytosis via a Di-leucine-based Motif, and Bidirectional Transcytosis of Chimera Encoding the Cytosolic Tail of Rat FcRn Expressed in Madin-Darby Canine Kidney Cells, *The Journal of biological Chemistry* 1999; 274: 8998-9005

Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L: Functional Analysis of -571 IL-10 Promotor Polymorphism Reveals a Repressor Element Controlled by Sp1, *The Journal of Immunology* 2004; 173: 3215-3222

Story CM, Mikulska JE, Simister NE: A Major Histocompatibility Complex Class I-like Fc Receptor Cloned from Human Placenta: Possible Role in Transfer of Immunoglobulin G from Mother to Fetus, *Journal of Experimental Medicine* 1994; 180: 2377-2381

Telleman P & Junghans RP: The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile, *Immunology* 2000; 100: 245-251

Tiwari B, Junghans RP: Funcional analysis of the mouse Fcgrt 5'proximal promoter, *Biochemica et Biophysica Acta* 2005; 1681: 88-98

Tovar D, Faye JC, Favre G: Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of VNTR sequence that affects transcriptional activity, *Genomics* 2003; 81: 525-530

Tzaban S, Massol RH, Yen E, Hamman W, Frank SR, Lapierre LA, Hansen SH, Goldenring JR, Blumberg RS, Lencer WI: The recycling and transcytotic pathway for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity, *Journal of Cell Biology* 2009; 185: 673-684

Urbaniak SJ, Duncan JI, Armstrong-Fisher SS, Abramovich DR, Page KR: Transfer of anti-D antibodies across the isolated perfused human placental lobule and inhibition by high-dose intravenous immunoglobulin: a possible mechanism of action, *British Journal of Heamatology* 1997; 96: 186-193

Vaughn DE, Bjorkman PJ: High-Affinity Binding of the Neonatal Fc Receptor to Its Ligand Requires Receptor Immobilisation, *Biochemistry* 1997; 36: 9374-9380

Vaughn DE, Milburn CM, Penny DM, Martin WL, Johnson JL, Bjorkman PJ: Identification of Critical IgG Binding Epitopes on the Neonatal Fc Receptor, *Journal of Molecular Biology* 1997; 274: 597-670

Wani MA, Haynes LD, Kim J, Bronson CL, Chaudhury C, Mohanty S, Waldmann TA, Robinson JM, Anderson CL 2006: Familial hypercatabolic hypoproteinemia caused by deficiency of the neonatal Fc receptor, FcRn, due to a mutant β_2 -microglobulin gene, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2006; 103: 5084-5089

Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans, *International Immunology* 2003; 15: 187-195

Ward ES, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Tang Q, Ober RJ: From Sorting Endosomes to Exocytosis: Association of Rab4 and Rab11 GTPase with the Fc Receptor, FcRn, during Recycling, *Molecular Biology of the Cell* 2005; 16: 2028-2038

West, Jr. AP, Bjorkman PJ: Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor, *Biochemistry* 2000; 39: 9698-9708

Williamson LM, Hackett G, Rennie J, Palmer CR, Maciver C, Hadfield R, Hughes D, Jobson S, Ouwehand WH: The Natural History of Fetomaternal Allomimmunization to the Platelet-Specific Antigen HPA-1a (PI^{A1}, Zwa) as Determined by Antenatal Screening, *Blood* 1998; 92: 2280-2287

Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Ssaki H: Microsatellite Polymorphism in the Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Is Associated with Susceptibility to Emphysema, *American Journal of Human Genetics* 2000; 66: 187-195

Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS: Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells, *Immunity* 2004; 20: 769-783

Yu Z, Lennon VA: Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune disease. *New English Journal of Medicine* 1999; 340: 227-228

Zhang R, Zhao Z, Zhao Y, Kaskovics I: Association of FcRn Heavy Chain Encoding Gene (FCGRT) Polymorphisms with IgG content in bovine colostrum, *Animal Biotechnology* 2009; 20: 242-246

Zhou J, Johnson JE, Gehtie V, Ober RJ, Ward ES: Generation of Mutated Variants of the Human Form of the MHC Class I-related Receptor, FcRn, with Increased Affinity for Mouse Immunoglobulin G, *Journal of Molecular Biology* 2003; 332: 901-913

Zhou X-J, Yu L, Zhu L, Hou P, Lv J-C, Yu F, Zhang H: Association between polymorphisms in the FCGRT gene and lupus nephritis in Chinese patients, *Clinical and Experimental Rheumatology* 2009; 27: 609-614

Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, Wang Y, Robert C, Wu B, Smith P, Lencer WI, Blumberg RS: MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages and Dendritic Cells, *The Journal of Immunology* 2001; 166: 3266-3276

Zupanska B, Brojer E, Richards Y, Lenkiewicz B, Seyfried H, Howell P, Serological and immunological characteristics of maternal anti-Rh(D) antibodies in predicting the severity of haemolytic disease of the newborn, *Vox Sanguinis* 1989; 56: 247–253

10 Publikationsverzeichnis

17th European Histocompatibility Conference, 11th Annual Meeting German Society of Immunogenetics, May 6-9, 2003, Baden-Baden

Christian G. Braeunlich, Sentot Santoso, G. Bein, Ulrich J. H. Sachs

„A short tandem repeat-polymorphism in the neonatal Fc receptor alpha-chain gene”

Sachs UJ, Socher I, **Braeunlich CG**, Kroll H, Bein G, Santoso S: A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor α -chain promoter, Immunology 2006; 119: 83-89

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Herzlichen Dank

meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gregor Bein für die Überlassung des Themas, sein Interesse an der Arbeit und die Bereitstellung der Möglichkeiten, die für die Umsetzung erforderlich waren,

Herrn Prof. Dr. Ulrich Sachs für seine wertschätzende und unterstützende Haltung in der direkten Betreuung der Arbeit,

Herrn Dr. rer. nat. Sentot Santoso und Herrn Dr. Hartmut Kroll für kritische und hilfreiche Anregungen in Bezug auf die strategisch-experimentelle Vorgehensweise und die wissenschaftliche Einordnung der Ergebnisse,

den MTAs Silke Werth, Heike Berghöfer und Olga Eva für ihre Unterstützung beim Erlernen und in der Durchführung der einzelnen labortechnischen, zell- und molekularbiologischen Verfahren und Vorgehensweisen,

allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen, mit denen ich direkt oder indirekt zusammengearbeitet habe, für ihre freundliche und hilfsbereite Art und Weise bei der Zusammenarbeit.